

cDNA-KLONIERUNG UND VOLLSTÄNDIGE PRIMÄRSEQUENZ
DER UNTEREINHEITEN ALPHA UND BETA
VON PHOSPHORYLASE-KINASE AUS SKELETTMUSKEL UND HERZ
DES KANINCHENS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
DIPL.-BIOL. NORBERT ZANDER
aus Mülheim

Bochum, 1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

cdNA- Klonierung und vollständige Primärsequenz
der Untereinheiten alpha und beta
von Phosphorylase-Kinase aus Skelettmuskel und Herz
des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*)

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr- Universität Bochum

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Norbert Zander
aus Mülheim

Bochum, 1989

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist bereits veröffentlicht worden:

Zander, N.F., Meyer, H.E., Hoffmann-Posorske, E., Crabb, J.W., Heilmeyer, L.M.G., Jr. and Kilimann, M.W. (1988) : cDNA cloning and complete primary structure of skeletal muscle phosphorylase kinase (alpha subunit).
Proc.Natl.Acad.Sci.US 85, 2929-2933.

Kilimann, M.W., Zander, N.F., Kuhn, C.C., Crabb, J.W., Meyer, H.E. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1988) : The alpha and beta subunits of phosphorylase kinase are homologous: cDNA cloning and primary structure of the beta subunit.
Proc.Natl.Acad.Sci.US, im Druck.

Inhalt

1.	Abkürzungsverzeichnis	
2.	Einleitung	1
3.	Material und Methoden	16
3.1.	Materialien und ihre Hersteller	16
3.1.1.	Feinchemikalien	16
3.1.2.	Enzyme	16
3.1.3.	Biologische Systeme/ Kits	17
3.1.4.	Sonstige Materialien	17
3.1.5.	Radioaktive Stoffe	17
3.1.6.	Escherichia coli- Stämme	17
3.2.	Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von RNA	18
3.2.1.	Präparation von RNA aus Kaninchengewebe	18
3.2.2.	Anreicherung von mRNA	19
3.2.3.	in vitro- Translation	21
3.2.3.1.	Immunpräzipitation von in vitro- Translationsprodukten	21
3.2.3.2.	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	23
3.2.4.	Immobilisierung von RNA auf feste Träger ("Northern Blotting")	25
3.3.	Analyse genomischer DNA ("Southern Blotting")	26
3.4.	Methoden zur Synthese und Klonierung von cDNA	27
3.4.1.	Synthese von cDNA	27
3.4.1.1.	Erststrangsynthese	27
3.4.1.2.	Zweitstrangsynthese	29
3.4.2.	Klonierung von cDNA in λ gt10	31
3.4.2.1.	Methylierung interner EcoRI- Stellen	31
3.4.2.2.	Anfügen der Linker und EcoRI- Verdau	32
3.4.2.3.	Fraktionierung der cDNA	32
3.4.2.4.	Ligieren der cDNA in λ gt10- Arme	33
3.4.2.5.	in vitro- "Packaging" der ligierten DNA	33
3.4.2.6.	Plattieren von λ gt10- Phagen	34
3.4.3.	Replizierung von cDNA- Banken	35
3.5.	Hybridisierungsmethoden	37
3.5.1.	Oligonukleotide	37
3.5.2.	Synthese und Aufreinigung von Oligonukleotiden	37
3.5.2.1.	Aufreinigung durch HPLC	38
3.5.2.2.	Aufreinigung durch präparative Polyacrylamidgelelektrophorese	38

3.5.3.	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	40
3.5.4.	Hybridisierung von Oligonukleotiden mit immobilisierten Nukleinsäuren	42
3.5.5.	Markierung von doppelsträngiger DNA	43
3.5.5.1.	Markierung nach Feinberg und Vogelstein	43
3.5.5.2.	"Nick- Translation"	45
3.5.6.	Hybridisierungsbedingungen mit markierter doppelsträngiger DNA	45
3.6.	Präparation klonierter DNA	46
3.6.1.	Präparation von Plasmiden(kleiner Maßstab)	46
3.6.2.	Präparation von Plasmiden(großer Maßstab)	47
3.6.3.	Präparation von λ gt10- Phagen (kleiner Maßstab)	49
3.6.4.	Präparation von λ gt10- Phagen (großer Maßstab)	50
3.6.5.	Isolierung von Restriktionsfragmenten	53
3.7.	Methoden zur Sequenzierung klonierter DNA	54
3.7.1.	Subklonierung in M13- Phagen	54
3.7.2.	Präparation einzelsträngiger rekombinanter M13- Phagen	57
3.7.3.	Sequenzierungsreaktion und Gelelektrophorese	58
3.7.4.	Sequenzierung G+C- reicher DNA	60
4.	Ergebnisse	62
4.1.	Klonierungsstrategie	62
4.2.	Nachweis von Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten durch in-vitro-Translation von mRNA	64
4.3.	Entwurf von Oligonukleotiden als Hybridisierungsproben	65
4.3.1.	Oligonukleotide komplementär zu mRNA-Sequenzen der α -Untereinheit	68
4.3.2.	Oligonukleotide komplementär zu mRNA-Sequenzen der β -Untereinheit	69
4.4.	Hybridisierungsbedingungen für die Hybridisierung mit Oligonukleotiden	70
4.5.	Nachweis von für Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten kodierenden mRNAs im "Northern Blot"	75
4.6.	cDNA- Banken	78
4.6.1.	Plasmid-cDNA-Bank aus weißem Kaninchenskelettmuskel	78
4.6.2.	Phagen-cDNA-Bank aus Kaninchenherz	78
4.7.	Klonierung der α -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase aus weißem Kaninchenskelettmuskel	79

4.8.	cDNA- Klone der β - Untereinheit von Phosphorylase-Kinase aus weißem Kaninchenskelettmuskel	81
4.9.	Sequenzdaten der cDNA- Klone der α - und β - Untereinheit von Phosphorylase-Kinase aus weißem Kaninchenskelettmuskel	82
4.9.1.	Sequenz der cDNA p α Phk1 und vollständige Primärsequenz der α - Untereinheit	82
4.9.2.	Sequenz der cDNA p β Phk-D1N und vollständige Primärsequenz der β - Untereinheit	88
4.10.	Homologie zwischen α - und β -Untereinheit von Phosphorylase Kinase	93
4.11.	Homologie der Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten mit anderen Proteinen	101
4.12.	Klonierung von cDNA-Klonen zur α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase aus Kaninchenherz	103
4.13.	Sequenzdaten der cDNA- Klone der α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase aus Kaninchenherz	105
4.13.1.	Sequenz der cDNA $\Delta\alpha$ HPhk1	105
4.13.2.	Sequenz der cDNA $\Delta\beta$ HPhk1	107
4.14.	Hybridisierung genomischer DNA mit cDNA des Klons p α Phk-D1	113
5.	Diskussion	115
5.1.	Klonierungsstrategie für cDNA- Moleküle	115
5.2.	Gewebespezifische Isoformen der Untereinheiten α und β von Phosphorylase - Kinase	119
5.2.1.	Differenzen zwischen strukturellen Daten auf Protein- und cDNA-Ebene der α - und β - Untereinheiten aus Herzmuskel	121
5.3.	Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der Phosphorylase-Kinase- Untereinheiten	124
5.3.1.	Homologie der beiden Untereinheiten	124
5.3.2.	Kein zusätzliches katalytisches Zentrum	126
5.3.3.	Aktivierung von Phosphorylase- Kinase durch cAMP-abhängige Proteinkinase	127
5.3.4.	Endogene Phosphoserine und Autophosphorylierungsstellen	131

5.3.5.	Calmodulinbindungsstellen	136
5.3.6.	Bindung von Nukleotiden	140
5.3.7.	Nichttranslatierte Abschnitte der cDNA- Klone	141
5.4.	Zahl, Lokalisation und Organisation der Struktur- gene der Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase	144
6.	Zusammenfassung	147
7.	Literaturverzeichnis	149

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaar(e)
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
cdNA	komplementäre DNA
cGMP	3',5'-cyclo-Guanosinmonophosphat
cpm	"counts per minute"
Da	Dalton
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphat
dNTP	2'-Deoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HPLC	"High Pressure Liquid Chromatography"
I	Inosin
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
MLLV	Moloney- Maus Leukämievirus
mRNA	"messenger"-RNA
NAD ⁺	Nikotinamidadenosindinukleotid (oxidiert)
OAc	Acetat
RT	Reverse Transcriptase
SDS	Natriumdodekylsulfat
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	"transfer"-RNA
U	"unit(s)"
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosid



2. Einleitung

Physiologie

Phosphorylase-Kinase (ATP:Phosphorylase b-phosphotransferase; EC 2.7.1.38) ist die als erste entdeckte regulatorische Proteinkinase. Krebs und Fischer beschrieben 1956 ein "Phosphorylase b zu a konvertierendes" Enzym aus Kaninchenskelettmuskel. Seit dieser Zeit sind mehr als hundert Proteinkinasen entdeckt worden. Reversible Proteinphosphorylierung ist einer der wichtigsten Wege, auf dem eukaryotische Zellen Signale aus dem Zelläußeren in intrazelluläre Signale umsetzen.

Phosphorylase-Kinase ist an der Signalkaskade beteiligt, die zur Glykogenolyse innerhalb der Zelle führt. Das ursprüngliches Signal hierzu kann sowohl neuronaler als auch hormoneller Natur sein. Phosphorylase-Kinase ist das erste Element, das beiden Signalwegen angehört. Abbildung 1 auf der folgenden Seite verdeutlicht dies. Die Signaltransduktion führt über mehrere Schritte der Amplifikation letztlich zur Aktivierung von Glykogen-Phosphorylase und zur Abspaltung von Glucose-1-Phosphat aus Glykogen. Die Aktivität von Phosphorylase-Kinase wird dabei über verschiedene "second messenger" sowohl auf dem Weg der kovalenten Modifikation des Enzyms als auch auf dem Weg allosterischer Effekte gesteuert.



Abbildung 1: Signalketten zur Aktivierung von
Phosphorylase-Kinase (Skelettmuskel)

Die neuronale Signalkette, die zur Glykogenolyse führt, nimmt ihren Anfang beim durch Depolarisation ausgelösten Calciumeinstrom in das Zellplasma. Calcium bindet an Calmodulin, welches ein integraler Bestandteil von Phosphorylase-Kinase ist (δ - Untereinheit) .

Die durch Hormone gesteuerte Signalkette nimmt ihren Anfang bei der Bindung von Adrenalin an β -adrenerge Rezeptoren in der Zellmembran. Dies führt zur Aktivierung einer Adenylatcyclase und zur Erhöhung der cAMP-Konzentration im Plasma. cAMP als "second messenger" aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase. Die Phosphorylierung bestimmter Serinreste in den α - und β - Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase durch diese Proteinkinase bewirkt eine Aktivierung des Enzyms.

Phosphorylase-Kinase phosphoryliert ihrerseits den Serinrest 14 im Phosphorylase b- Molekül (Picket-Gies and Walsh, 1986). Dies führt zur Bildung eines aktiven Phosphorylase-Tetramers (Phosphorylase a) aus zwei inaktiven Dimeren (Phosphorylase b).

Diese Aktivierung ist durch Entfernen der eingefügten Phosphatreste durch Phosphorylase-Phosphatase reversibel. Auch Glykogen-Synthase, Troponin T und Troponin I können durch Phosphorylase-Kinase in vitro phosphoryliert werden, die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch unklar.

Im Muskelgewebe stellt Phosphorylase-Kinase etwa 1% der im Zellplasma löslichen Proteine. Das Enzym aus Kaninchenskelettmuskel ist die am besten strukturell und enzymatisch untersuchte Form dieses Enzyms.

Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase

Wie viele andere Proteinkinasen besteht Phosphorylase-Kinase aus einem Komplex von katalytischen und regulatorischen Untereinheiten. Das Enzym ist ein großes oligomeres Protein der Komposition $(\alpha \beta \gamma \delta)_4$ und besitzt ein Molekulargewicht von 1.3 MDa (Hayakawa et al., 1973; Cohen, 1973). Das apparente Molekulargewicht der verschiedenen Untereinheiten ist bekannt, die Molekulargewichte betragen:

α	:	138.000	Da
β	:	125.000	Da
γ	:	45.000	Da
δ	:	12.000	Da.

Hinweise auf die räumliche Anordnung der Untereinheiten im Komplex liefern elektronenmikroskopische Untersuchungen (Trempe et al., 1986) und "Cross-linking"-Versuche (Picton et al., 1980; Lambooy and Steiner, 1982). Der Phosphorylase-Kinase-HoloKomplex weist eine symmetrische Architektur auf; er ähnelt zwei entgegengesetzten Klammern, die durch zwei kurze Brücken zusammengehalten werden. Chan und Graves (1982) gelang durch LiBr-vermittelte Dissoziation der Nachweis der Teilkomplexe $\alpha\gamma\delta$ und $\gamma\delta$. "Cross-linking"-Versuche mit Dimethylsuberimat liefern Dimere des Typs $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\gamma$ und Trimere des Typs $\alpha\beta\gamma$ und $\beta\gamma\gamma$.

Die α - und β -Untereinheiten sind bei der Bindung exogenen Calmodulins (δ') beteiligt (s.u.). Ein Modell für

eine mögliche Anordnung der Untereinheiten im Holo-komplex, das auf den Ergebnissen dieser Experimente beruht, zeigt Abbildung 2 (aus: Picket-Gies and Walsh, 1986):

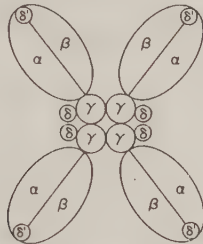


Abbildung 2: Mögliche Anordnung von Untereinheiten im Phosphorylase-Kinase-Holo-komplex

Calmodulin

Die Aktivität von Phosphorylase-Kinase ist calciumabhän-gig. Calcium bindet an die δ - Untereinheit des Enzyms und aktiviert hierdurch den Enzymkomplex.

Anders als bei den anderen bekannten Calcium-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen bleibt die δ - Untereinheit auch bei Abdissoziation der Calciumionen ein integraler Be-standteil des Holo-komplexes.

Die Bindung von Calcium an Phosphorylase-Kinase und die daraus resultierende Aktivierung des Enzyms waren Gegen-stand intensiver Untersuchungen. Kilimann und Heilmeyer (1977) konnten am Holoenzym und Kohse und Heilmeyer (1981) an der isolierten δ - Untereinheit vier Bindungs-stellen unterscheiden. Zwei zeigen eine Kompetition zwis-chen Calciumionen und Magnesiumionen und besitzen eine Bindungskonstante für Calcium von 4 μ M. Zwei Bindungs-stellen niedrigerer Affinität können nur Calciumionen mit

einer Bindungskonstante von 40 μM binden.

Abhängig von der Calcium-Konzentration konnten Kilimann und Heilmeyer (1982 a,b) drei verschiedene Typen von Phosphorylase-Kinase-Aktivitäten unterscheiden: die Aktivität A_0 ist sehr gering und unabhängig von der Calciumkonzentration. Die Aktivität A_1 beruht auf der Bindung des Calciums an die hochaffinen Bindungsstellen im Calmodulin; Magnesium ist ein mit Calcium kompetitiver Inhibitor dieser Aktivität. Die Aktivität A_2 , die auf der Besetzung auch der niedrig affinen Bindungsstellen im Calmodulin durch Calcium beruht, ist durch Magnesiumionen induzierbar.-

Obwohl Phosphorylase-Kinase in Form der δ -Untereinheit ein Molekül Calmodulin pro Tetramer enthält, kann es reversibel ein zweites Molekül dieses regulatorischen Proteins pro Tetramer binden. "Crosslinking"-Experimente zeigen, daß hieran die Untereinheiten α und β beteiligt sind (Picton et al., 1980). Bindung eines zusätzlichen Äquivalents Calmodulin stimuliert bei pH 6.8 und unter sättigender Calciumkonzentration die Aktivität des Enzyms um etwa 50 %.

Katalytische Untereinheit

Die γ -Untereinheit besitzt katalytische Aktivität (Skuster et al., 1980). Die Primärstruktur dieser Untereinheit ist auf proteinchemischem Weg ermittelt worden (Reimann et al., 1984). Das Polypeptid ist homolog zu

katalytischen Untereinheiten oder Domänen einer Reihe weiterer bekannter Proteinkinasen. Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat cDNA- Moleküle kloniert, die für die γ -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase kodieren (Chamberlain et al., 1987; Bender et al., 1987, da Cruz e Silva et al., 1987).

α - und β - Untereinheit

Die α - und β - Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase machen zusammen etwa 80% des Komplexes aus. Die Primärstruktur dieser Untereinheiten war bisher nicht bekannt. Die beiden Untereinheiten tragen mehrere Serinreste, deren Phosphorylierung den Gesamtkomplex aktiviert. Ein Teil dieser Serine trägt bereits Phosphatgruppen im nichtaktivierten Zustand des Komplexes ("endogenes Phosphat").

Eine reversible Phosphorylierung von Serinresten kann durch die Aktion zweier Enzyme erreicht werden.

Zum einen kann die bereits erwähnte cAMP-abhängige Proteinkinase bestimmte Serinreste phosphorylieren. Dieses Enzym steht unter hormoneller Kontrolle und benötigt kein Calcium für seine Aktivität (Walsh et al., 1971). Die Phosphorylierung eines bestimmten Serinrestes in der β -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase geht einher mit einer simultanen Aktivierung des Enzyms. Nach einer gewissen Zeit beginnt die Phosphorylierung eines Serinrestes in der α - Untereinheit; dies führt zur Dephosphorylierung der β -Untereinheit durch Phosphorylase-Kinase-

Phosphatase und zur Deaktivierung des Enzyms (Cohen, 1974; Cohen et al., 1975).

Die Sequenz der beiden durch die cAMP- abhängige Proteinkinase phosphorylierten Peptide ist bekannt (Cohen et al., 1975).

Die Phosphorylierung von Phosphorylase-Kinase durch cAMP-abhängige Proteinkinase in Reaktion auf eine Adrenalin-gabe konnte auch in vivo gezeigt werden (Yeaman et al., 1975).

Die cAMP-abhängige Proteinkinase vermag nur solche Serinreste zu phosphorylieren, die in einem Abstand von einem bis zwei Resten in Richtung auf den N- Terminus mindestens zwei aufeinander folgende basische Aminosäurereste besitzen.

Der zweite Weg der Phosphorylierung des Enzyms besteht in der Autophosphorylierung. Abhängig von den experimentellen Bedingungen kann das Enzym in vitro bis zu 70 Mol Phosphat pro Holokomplex in seine eigenen α - und β -Untereinheiten einfügen (Kilimann and Heilmeyer, 1982b). Die genaue Position dieser Autophosphorylierungsstellen war bisher unbekannt. Unklar ist, in welchem Ausmaß die Autophosphorylierung in vivo an der Aktivierung des Phosphorylase-Kinase-Komplexes beteiligt ist.

Durch welche intra- und intermolekularen Prozesse im einzelnen die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase zur Aktivierung des Enzyms führt, ist unbekannt.

Im Fall der cAMP- abhängigen Proteinkinase beruht die Wirkung des "second messenger" cAMP in einer Dissoziation des Enzymkomplexes und einer Freisetzung der dann voll aktiven katalytischen Untereinheit. Im Fall der cGMP- abhängigen Proteinkinase ruft die Bindung von cGMP keine Dissoziation von katalytischem und regulatorischem Zentrum hervor, da beide sich in derselben Polypeptidkette befinden. Hingegen dürfte eine Änderung der Tertiärstruktur das katalytische Zentrum für das Substrat zugänglicher machen (Lincoln et al, 1977).

Auf ähnliche Weise ist die Aktivierung von Phosphorylase-Kinase vorstellbar. Die katalytische Untereinheit γ wird durch Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten des Komplexes in einer inaktiven Form fixiert. Calciumbindung an die δ -Untereinheit ist der primäre Schritt der Aktivierung des Komplexes; Phosphorylierung der α - und β -Untereinheiten verstärkt die Aktivierung. Beide Prozesse könnten zunächst zu einer Änderung der Tertiärstruktur der betroffenen Untereinheit und als Folge davon zu einer Veränderung der Interaktion mit der γ - Untereinheit führen, die auf diese Weise in eine aktivere Form übergehen kann. Diese Vorstellung wird durch die begrenzte Proteolyse des Enzyms unterstützt. Ein begrenzter Verdau von Phosphorylase-Kinase etwa durch Trypsin, Chymotrypsin oder Thermolysin führt zunächst zur Degradation der α - Untereinheit. Parallel dazu steigt die Aktivität des Enzyms stark an.

ADP bindet an die β - Untereinheit und stimuliert

allosterisch das nichtaktivierte Enzym (Cheng et al., 1985).-

Obwohl die Hauptfunktion der beiden großen Untereinheiten in der Regulation der Enzymaktivität liegt, wird die Existenz eines zweiten katalytischen Zentrums auf einer dieser beiden Untereinheiten seit langem diskutiert. Einige Befunde stützen diese Hypothese.

Eine Reihe von Autoren berichten über Markierung der großen Untereinheiten mit ATP-Affinitätsliganden. So kann Fluoresceinisothiocyanat an ein bestimmtes Lysin der α -Untereinheit binden; diese kovalente Modifikation wird durch ATP gehemmt (Zaman et al., im Druck). Eine ATP-Bindungsstelle wäre ein nötiger Bestandteil eines weiteren katalytischen Zentrums.

Anhand der Aktivierung von Phosphorylase-Kinase durch Calcium können drei Aktivitäten des Enzyms mit unterschiedlichen Proteinsubstratspezifitäten unterschieden werden (Kilimann and Heilmeyer, 1982b). Eine Erklärung hierfür könnte die Existenz mehrerer unabhängiger katalytischer Zentren sein.

King et al. (1981) modifizierten Phosphorylase-Kinase mit einem ATP-Derivat und fanden, daß die Reaktivität des Enzyms in bezug auf verschiedene seiner Substrate durch diese Modifikation unterschiedlich beeinflusst wurde. Die Existenz zweier katalytischer Zentren mit unterschiedlichen Spezifitäten für bestimmte Klassen von Substraten könnte dies erklären.

Auch die Bindung von Antikörpern an Phosphorylase-Kinase

beeinflusst ihre Aktivität inbezug auf verschiedene Substrate differentiell (Hessova et al., 1985; Dickneite et al., 1978).

Ein 33 kDa großes, katalytisch aktives, Fragment aus einem begrenzten Verdau von Phosphorylase-Kinase mit Trypsin wurde von Fischer et al. (1978) der β - Untereinheit zugeordnet.

Letztlich kann nur mit Kenntnis der Primärstruktur der großen Untereinheiten die Frage nach der Existenz weiterer katalytischer Zentren beantwortet werden, da die katalytischen Untereinheiten oder Domänen aller bisher bekannten Proteinkinasen ausgeprägte Ähnlichkeiten in ihrer Primärstruktur zeigen (Hanks et al., 1988).

Isoformen

Es gibt zelltypspezifische Isoformen von Phosphorylase-Kinase. Die Isoformen von weißem Skelettmuskel und aus Leber (Chrisman et al., 1982) zeichnen sich durch die α -Untereinheit (apparentes Molekulargewicht 138 kDa) aus, wohingegen im roten Skelettmuskel (Jennissen und Heilmeyer, 1974) und im Herzen (Cooper et al., 1980) die größte Untereinheit die um 5 kDa verkleinerte α' - Untereinheit ist.

Es gibt Hinweise für die Existenz einer neonatalen Isoform (Gross et al., 1977; Daegelen-Proux et al., 1978).

Strukturelle Informationen über die verschiedenen Isoformen liegen bisher nicht vor.

Erbliche Defekte von Phosphorylase-Kinase

Erbliche Defekte von Phosphorylase-Kinase sind für verschiedene Spezies beschrieben.

Beim Menschen handelt es sich um Formen von Glykogenosen des Typs IX (Howell, 1983). Form IXa betrifft hauptsächlich die Leberform des Enzyms und wird X-chromosomal vererbt; Typ IXb betrifft die Leber- und die Muskelform von Phosphorylase-Kinase und wird rezessiv autosomal vererbt. Symptome sind eine milde Häpatomegalie, ein erhöhter Glykogenspiegel in den betroffenen Organen und eine milde Hypoglykämie.

Einen Defekt in der Leberform von Phosphorylase-Kinase zeigen ebenfalls Ratten des gsd- Stamms (Malthus et al., 1980). Die Aktivität von Phosphorylase-Kinase in der Leber dieser Ratten beträgt nur 10% der Aktivität in Wildtypmatten. Dies führt bei einer insgesamt konstanten Menge an Glykogen-Phosphorylase zu einem Mangel an aktiver Phosphorylase a, der sich in einem erhöhten Leberglykogenspiegel und in einer Häpatomegalie niederschlägt.

Der Defekt wird autosomal rezessiv vererbt.

Hingegen liegt bei Mäusen des I-Stammes (Lyon, 1957) eine Defizienz der Muskelisoform von Phosphorylase-Kinase vor (Cohen et al., 1976). Im Skelettmuskel dieser Mäuse ist nur 0.2% der normalen Phosphorylase-Kinase-Aktivität nachweisbar (Lyon, 1970). Die Defizienz betrifft auch den roten Skelettmuskel und das Herz.

In Muskelextrakten von I-Mäusen können die α , β und die γ - Untereinheit von Phosphorylase-Kinase nicht nachgewie-

sen werden.

Die Defizienz, an der die I-Mäuse leiden, wird X- chromosomal und rezessiv vererbt. Ob der Defekt in einem Strukturgenen einer der Untereinheiten des Enzyms oder in einem Kontrollgen liegt, das für die koordinierte Expression der Strukturgene verantwortlich ist, ist unbekannt. Die Restaktivität von Phosphorylase-Kinase könnte auf die Existenz einer vom Defekt nicht betroffenen fötalen Isoform zurückzuführen sein. -

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klonierung der α - und β - Untereinheit von Phosphorylase-Kinase aus dem weißen Skelettmuskel des Kaninchens und die Aufklärung der Primärstruktur dieser Untereinheiten. Ausgehend von den bestimmten Sequenzen gereinigter Peptide aus den Untereinheiten sollen zunächst spezifische Hybridisierungsproben in Gestalt von Oligonukleotiden entworfen werden, die zu mRNAs der gesuchten Proteine komplementär sind. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide klonierte cDNA-Moleküle sollen dann weiter, bis auf die Ebene ihrer Nukleotidsequenz, charakterisiert werden.

Die Kenntnis der Primärstruktur der α - und β - Untereinheit kann Rückschlüsse auf ihre jeweilige Funktion zulassen. Durch Vergleich mit anderen, schon bekannten, Sequenzen läßt sich zum Beispiel klären, ob das Enzym über ein weiteres katalytisches Zentrum verfügt.

Eine Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen sowie putativen Calmodulin- oder Nukleotidbindungsstellen in

der Primärsequenz der Untereinheiten kann möglich werden. Eine Homologie zu anderen Proteinen kann Aufschluß über die Evolutionsgeschichte von Phosphorylase-Kinase geben. Sind die Phosphorylase-Kinase- Untereinheiten aus weißem Skelettmuskel kloniert, ermöglichen die cDNA-Moleküle als spezifische Hybridisierungsproben die Klonierung anderer Transkripte der zugrundeliegenden Strukturgene oder die Klonierung von Transkripten eng verwandter Strukturgene. Auf diese Weise kann die Struktur der verschiedenen gewebe- und entwicklungsspezifischen Isoformen des Enzyms bestimmt werden.

cDNA-Klone können außerdem zur Lokalisierung der Strukturgene im Genom und zur Klonierung dieser Strukturgene benutzt werden.

Zuletzt schafft die Verfügbarkeit von cDNA der Phosphorylase-Kinase- Untereinheiten einen Zugang zur Charakterisierung der molekularen Ursachen der verschiedenen Defizienzen dieses Enzyms. Dies könnte positive Auswirkungen auf die klinische Diagnose der menschlichen Defizienzen haben.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und ihre Hersteller

3.1.1. Feinchemikalien

Actinomycin	Sigma, Deisenhofen, BR Deutschland
Acrylamid	Biomol, Ilvesheim, BR Deutschland
Agar	Gibco, Paisley, Großbritannien
Agarose	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg, USA
Ampicillin	Serva, Heidelberg, BR Deutschland
Caesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, BR Deutschland
Chloramphenicol	Serva
Coomassie Brilliantblau	Merck, Darmstadt, BR Deutschland
Deoxynukleosidtriphosphate	Pharmacia, Uppsala, Schweden; Amersham, Amersham, Großbrit.
Dideoxynukleosidtriphosphate	Pharmacia; Amersham
Dimethyldichlorosilan	Sigma
Dimethylsulfoxid	Merck
Dithiothreitol	Serva
DNA (Hering)	Pharmacia
EN ³ HANCE- Lösung	NEN/DuPont de Nemours, Boston, USA
Ficoll	Serva
Formamid	Riedel-de Haen, Seelze, BR Deutschl.
Glucose	Baker, Deventer, Niederlande
Glyoxal	Sigma
Harnstoff	Serva
Heparin	Serva
IPTG	Biomol
Lithiumchlorid	Merck
Maltose	Serva
B- Mercaptoethanol	Merck
γ -Metacryloxypropantrimethoxy- oxysilan	Serva
M13-Sequenzierungsprimer	Amersham; Pharmacia
N,N'-Methylenbisacrylamid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
NAD ⁺	Pharmacia
Nonidet P 40	Sigma
Oligo-dT ₁₂₋₁₈	Pharmacia
Pansorbin	Behring Diagnostics, La Jolla, CA
Polyethylenglykol (6000)	Serva
Polyvinylpyrrolidon	Merck
Rinder Serumalbumin	Pharmacia
TEMED	Fluka
Tetramethylammoniumchlorid	Roth
tRNA (Hefe)	BRL
Trypton	Gibco
X- Gal	Biomol

3.1.2. Enzyme

DNA- Ligase (NAD ⁺ -abh.)	Pharmacia;
DNA- Ligase (T 4)	Stehelin AG, Basel, Schweiz Stehelin ; Amersham

DNA- Polymerase I	Stehelin
DNA- Polymerase (T 4)	BRL
DNAse I	Boehringer, Mannheim, BR Deutschl.
Klenow- Enzym	Boehringer; Pharmacia
Lysozym	Serva
MMLV- RT	BRL
Polynukleotidkinase (T 4)	BRL
Proteinase K	Serva
RNAse A	Boehringer
RNAse H	Stehelin ; BRL.
RNAse Inhibitor	Stehelin ; Pharmacia
Sequenzyme	Stehelin

3.1.3. Biologische Systeme/ Kits

"Random Primed DNA Labelling Kit"	Boehringer
Retikulozytenlysat/L- ³⁵ S- Methionin-Translationssystem	NEN/Du Pont de Nemours, Boston, USA
1gt10- Klonierungssystem	Amersham
M13- Klonierungssystem	Amersham
M13- Sequenzierungssystem	Amersham
Protophone 1gt10- System	Promega Biotec., Madison, USA.
Sequense- DNA Sequencing Kit	United States Biochemical Corporation, Cleveland, USA.

3.1.4. Sonstige Materialien

Biodyne- Nylonfolie	Pall, Dreieich, BR Deutschland
DEAE- Cellulose	Merck
DE81- Papier	Whatman, Maidstone, Großbrit.
DE82- Cellulose	Whatman
Hybond N- Folie	Amersham
Nitrocellulosefolie	Schleicher&Schüll, Dassel, BRD
3 MM- Papier	Whatman

3.1.4. Radioaktive Substanzen

L- ³⁵ S- methionin	Amersham
α - ³⁵ S- thio-dATP	Amersham
γ - ³² P- Phosphat	NEN/Du Pont de Nemours
α - ³² P- dATP	NEN/Du Pont de Nemours
α - ³² P- dCTP	NEN/Du Pont de Nemours

3.1.4. Escherichia coli- Stämme

DH 5	BRL
JM 101, JM 103	Amersham
NM 514	Amersham
RR 1	BRL

3.2. Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von RNA

3.2.1 Präparation von RNA aus Kaninchengeweben

Die Präparation von RNA aus Geweben erfolgt nach der leicht modifizierten Methode von Auffray und Rougeon (1980).

Homogenisationspuffer

6	M Harnstoff
3	M LiCl
10	mM NaOAc
0.1	% SDS
0.2	mg/ml Heparin (unmittelbar vor Homogenisation zugeben !)

Ein männliches Kaninchen wird durch Injektion eines Barbiturats (Evipan) betäubt und aus der Halsvene ausgeblutet.

Die interessierenden Gewebe werden entnommen, mechanisch grob zerkleinert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gewebeproben werden zusammen mit der zehn- bis zwanzigfachen Menge an Homogenisierungspuffer zwei Minuten im Waring Blendor homogenisiert und anschließend über Nacht bei 0°C inkubiert.

Das Homogenat wird 20 Minuten bei 4°C und 7000 g zentrifugiert, das Pellet wird drei Mal mit 10 ml 8 M Harnstoff, 4 M LiCl gewaschen und anschließend 5 Minuten lang bei 50°C in 10mM Tris/HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.5 % SDS (0.3 ml pro g Gewebe) aufgenommen. Die Lösung wird auf 0.3 M NaOAc gebracht und drei Mal mit derselben Menge

Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert; die letzte wäßrige Phase wird drei Mal mit demselben Volumen Diethylether extrahiert und die RNA durch Zugabe der zweieinhalbfachen Menge Ethanol gefällt. Nach Inkubation bei -70°C für mehr als 30 Minuten wird die gefällte RNA 30 Minuten bei 4°C und 8000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet und in 10 mM Tris/HCl pH 7.6, 1 mM EDTA aufgenommen (10 μl pro g Gewebe).

Die RNA- Menge wird spektrophotometrisch bestimmt.

1 μg der RNA wird auf einem 1 %- Agarosegel auf Intaktheit überprüft.

3.2.2. Anreicherung von mRNA

Die Anreicherung von mRNA erfolgt mit leichten Modifikationen nach der von Maniatis et al. (1982) angegebenen Methode.

Ladepuffer

0.5 M NaCl
5 mM EDTA
10 mM Tris/ HCl pH 7.6
0.2 % SDS

"Zwischenpuffer"

150 mM NaCl
5 mM EDTA
10 mM Tris/ HCl pH 7.6
0.2 % SDS

Elutionspuffer

5 mM EDTA
10 mM Tris/ HCl pH 7.6

Zur Anreicherung von poly(A)⁺-RNA dient die Oligo- dT- Säulenchromatographie. 20 mg Oligo- dT- Cellulose pro mg RNA werden in 0.1 ml Elutionspuffer vorgequollen , in die Säule gegeben und mit 20 ml Ladepuffer äquilibriert. Die Gesamt- RNA wird 5 Minuten lang auf 65°C erhitzt, auf 0.5 M NaCl und 0.2 % SDS gebracht und sodann auf die Säule aufgetragen. Nach 5 Minuten wird mit dem Sammeln von 2 ml- Fraktionen begonnen. Auf die Säule werden nacheinander aufgegeben :

10 ml Ladepuffer
10 ml Zwischenpuffer
10 ml Elutionspuffer.

Nach jedem Pufferwechsel wird die Säule für 10 Minuten angehalten.

Der RNA- Gehalt aller Fraktionen wird spektrophotometrisch bestimmt, poly(A)⁺- Fraktionen werden vereinigt, auf 0.3 M NaOAc gebracht und durch Zugabe der zweieinhalbfachen Menge Ethanol gefällt. Nach Inkubation bei -70°C für mehr als 30 Minuten wird die RNA abzentrifugiert (30 Minuten, 4°C, 8000 g), mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und in 1 mM Tris/ HCl pH 8.0 , 0.1 mM EDTA aufgenommen.

Die Endkonzentration beträgt 1 µg/µl.

Die so angereicherte poly(A)⁺- RNA wird für in vitro- Translationsexperimente und cDNA- Synthesen eingesetzt.

3.2.3. In vitro- Translation

Reagentien für die in vitro- Translation werden dem "Retikulozytenlysat/Methionin, L-³⁵S Translationssystem" (Du Pont de Nemours) entnommen.

Ein Standardansatz enthält:

5	µCi	³⁵ S- Methionin (> 800 Ci/mMol)
5.5	µl	Translationscocktail
2	µl	1 M KCl
0.5	µl	35 mM MgCl ₂
10	µl	Retikulozytenlysat
1	µg	poly(A) ⁺ - RNA (bzw. 20 µg (poly(A) ⁻ -RNA)

und wird zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1µl RNase A (1 µg/ml in 25 mM EDTA) und Inkubation bei 37°C für weitere 10 Minuten wird die Reaktion beendet.

Der Translationsansatz kann direkt oder nach zwischengeschalteter Immunpräzipitation von Translationsprodukten auf einem Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) analysiert werden .

3.2.3.1. Immunpräzipitation von in vitro- Translationsprodukten

NET

150	mM	NaCl
0.5	%	Nonidet P 40 (Sigma)
5	mM	EDTA
50	mM	Tris/ HCl pH 7.6

BSA-NET

400 mM NaCl
 12.5 mg/ml Rinderserumalbumin
 0.5 % Nonidet P 40
 50 mM Tris/HCl pH 7.6

(steril filtrieren und kühl lagern)

Probenpuffer für Proteingel

40 mM Tris/ HCl pH 6.8
 4 % SDS
 34 % Glyzerin
 4 % β - Mercaptoethanol
 wenig Bromphenolblau

Zur Immunpräzipitation von Phosphorylase- Kinase- Unter-
 einheiten dienen zwei monoklonale Antikörper und ein
 Gesamtantiserum gegen Phosphorylase Kinase. Folgende
 Antikörpermengen werden für je eine Präzipitation einge-
 setzt (Hessova et al., 1985):

KIN 666/III C6 :	2.5 μ g gereinigtes Protein
KIN 692/I A4 :	200 μ g Protein aus Kultur- überstand
Gesamtserum :	8 μ g Protein

Antikörper werden mit 0.1 ml BSA-NET 40 Minuten lang auf
 Eis inkubiert. Es werden jeweils zwei Parallelansätze
 inkubiert, wobei der eine zusätzlich eine überschüssige
 Menge an gereinigter Phosphorylase Kinase enthält (3 μ g).
 Pro Präzipitationsansatz werden je 8.25 μ l eines Transla-
 tionsansatzes mit 100 μ l BSA-NET und 5 μ l Pansorbin 15
 Minuten auf Eis zum Abtrennen unspezifisch ans Pansorbin
 bindender Proteine vorinkubiert; hiernach wird das Pan-
 sorbin abzentrifugiert.-

Der Überstand des vorgereinigten Translationsansatzes wird mit der vorinkubierten Antikörperlösung (Mengen siehe oben) versetzt. Zwei Parallelansätze werden jeweils verwendet. In einem Ansatz befinden sich die in-vitro-Translationsprodukte und der entsprechende Antikörper, der Parallelansatz enthält zusätzlich zu Kompetitionszwecken authentische Phosphorylase Kinase im Überschuß (vgl. Vorinkubation der Antikörper).

Nach Inkubation für 30 Minuten auf Eis wird mit 10 µl Pansorbin versetzt und 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Pansorbin durch Zentrifugieren abgetrennt und drei Mal mit 0.8 ml NET gewaschen.

Nach Abheben des letzten Überstandes werden die Pansorbinpellets mit 10 µl Wasser und 5 µl Probenpuffer versetzt und darin suspendiert. Nach Kochen für 2 Minuten werden die Proben auf ein Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) aufgetragen. Je 1.6 µl des ursprünglichen Translationsansatzes und 3 µg authentischer Phosphorylase Kinase werden zum Vergleich ebenfalls aufs Gel aufgetragen.

3.2.3.2. SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Acrylamid-Stammlösung

300	g/l	Acrylamid
8	g/l	N,N'-Methylenbisacrylamid

Laufpuffer

50 mM Tris/ HCl pH 8.3
 380 mM Glycin
 0.1 % SDS

Für Trenn- und Sammelgelansatz werden zusammengegeben(in ml) :

	Trenngel	Sammelgel
Acryamidstammlösung	9.0	1.0
0.5 M Tris/HCl pH 6.8		2.5
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	7.5	
20 % SDS	0.15	0.05
10 % Ammoniumpersulfat	0.1	0.1
TEMED	0.0075	0.005

Der Trenngelansatz polymerisierte über Nacht, der Sammelgelansatz eine Stunde. Die Proben werden im Probenpuffer 2 Minuten lang gekocht (vgl. 3.2.3.1.) und aufgetragen. Die Proteine werden bei 80 V elektrophoriert, bis die Farbstofffront die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht hat; die weitere Elektrophorese erfolgt bei 200 V. Nach Erreichen des Gelendes durch die Farbstofffront werden die Proteine angefärbt (30 Minuten in 2.5 g/l Coomassie Brilliantblau, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure) und fixiert (mehrere Stunden in 5 % Methanol, 7 % Essigsäure). Nach einstündiger Inkubation in EN³HANCE zur Verstärkung der autoradiographischen Signale und anschließender Wässerung für 30 Minuten wird das Gel getrocknet und autoradiographiert.

3.2.4. Immobilisierung von RNA auf feste Träger ("Northern Blotting")

Die Methode ist in ihren Grundzügen von Maniatis et al. (1982) beschrieben und wird leicht modifiziert angewendet.

Laufpuffer

10 mM NaH_2PO_4 pH 7.0

Transferpuffer

3 M NaCl

20 mM EDTA

0.2 M NaH_2PO_4

auf pH 7.4 eingestellt mit NaOH

Probenpuffer

50 % Glyzerin

4 mg/ml Bromphenolblau

10 mM NaH_2PO_4 pH 7.0

Die gesamte Prozedur erfolgt RNase-frei, das heißt mit autoklavierten oder steril filtrierten Reagentien, autoklavierten Reaktionsgefäßen und sorgfältig mit Ethanol gereinigten Apparaturen. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen werden die zu transferierenden RNA- Proben zunächst glyoxaliert. Hierzu werden zusammengegeben:

3.7 µl	entsprechend verdünnte oder ankonzentrierte RNA (höchstens 20 µg)
2.7 µl	6 M deionisiertes Glyoxal pH 7.0
8 µl	Dimethylsulfoxid
1.6 µl	0.1 M NaH_2PO_4 pH 7.0.

Der Ansatz wird eine Stunde bei 50°C inkubiert, anschließend mit 4 µl Probenpuffer versetzt und auf ein 0.9

% - Agarosegel (in Laufpuffer) gegeben. Als Größenstandards dienen die ribosomalen RNA- Bestandteile von (poly-A)⁻-RNA. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V unter steter Umwälzung des Laufpuffers.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Standardspuren in 0.5 µg/ ml Ethidiumbromid angefärbt. Das Gel wird auf einen 3 MM -Papierstreifen (Whatman) gelegt, der in ein Reservoir mit 200 ml Transferpuffer taucht. Auf das Gel wird die Transfermembran - Nitrocellulose oder eine Nylonfolie - plaziert. Auf die Folie werden zwei weitere Lagen 3 MM- Papier und eine Schicht von saugfähigem Papier in Höhe von etwa 5 cm gelegt, die durch ein Gewicht von 200 g fixiert werden. Beim gesamten Aufbau wird darauf geachtet, keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zurückzulassen. Der Transfer erfolgt über Nacht. Anschließend wird die Transfermembran 2 Stunden lang bei 80°C unter Vakuum gebacken.

3.3. Analyse genomischer DNA ("Southern Blotting")

Genomische DNA aus einer menschlichen, lymphoblastoiden Zelllinie ("GM1416B") mit dem Karyotyp 48, XXXX und genomische DNA aus Blutzellen des Karyotyps 46, XY wurde von Prof.Dr. Karl-Heinz Grzeschik (Institut für Humangenetik der Westfälischen Wilhelms- Universität, Münster) zur Verfügung gestellt. 10 µg DNA aus beiden DNA- Präparationen wird mit PvuII verdaut (20 U, 3 h 37°C) und über ein 0.8% - Agarosegel aufgetrennt.

Das Gel wird zweimal 15 Minuten in 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl denaturiert und zweimal 15 Minuten in 0.5 M Tris/HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl neutralisiert. Die DNA wird über Nacht wie unter 3.2.4. beschrieben auf eine Membran (Hybond N) transferiert. Anschließend wird das Gel zur Transferkontrolle 30 Minuten lang in 0.5 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt. Zur Immobilisierung der DNA an die Membran wird diese 5 Minuten lang mit UV- Licht der Wellenlänge 305 nm bestrahlt.

3.4. Methoden zur Synthese und Klonierung von cDNA

3.4.1. Synthese von cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgt nach der Methode von Gubler und Hoffmann(1983).

3.4.1.1. Erststrangsynthese

Zur Auflösung von Sekundärstrukturen werden zunächst 5 µg (poly-A)⁺-RNA in einem Volumen von 20 µl mit 10 mM CH₃HgOH 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesem Ansatz werden 2 µl 1 M Dithiothreitol und 1.5 µl RNase Inhibitor (45 U) hinzugegeben und der Ansatz wird weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden zugefügt:

2	mg	Actinomycin
10	μ l	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP
20	μ l	5 x MMLV- RT Puffer (250 mM Tris/HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 50 mM DTT, 15 mM $MgCl_2$)
4	μ l	2.5 mg/ml Rinderserumalbumin (DNase-, RNase-frei)
1	μ l	3000 Ci/mMol α - ^{32}P - dATP (5 μ Ci)
5	μ l	1 μ g/ μ l Oligo-dT ₁₂₋₁₈

Nach weiterer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur werden 1000 U MMLV- Reverse Transcriptase zugefügt. Es wird 40 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Vor Zugabe des Enzyms und nach 20, 30 und 40 Minuten werden dem Ansatz zur Analytik je zwei Mal 0.9 μ l entnommen und auf DE 81- Papier aufgetropft. Die Reaktion wird durch Einfrieren bei -70°C beendet.

Von den je zwei Parallelproben wird die eine zur Abtrennung von gebundenem ^{32}P -dATP vier Mal 5 Minuten in 0.5 M Na_2HPO_4 gewaschen, die andere dient als Referenzwert für die insgesamt vorhandene Radioaktivität. Die Radioaktivität aller Proben wird in 5 ml Wasser im 3H - Kanal (Cerenkov- Effekt) szintillographisch gemessen. Das Verhältnis von Waschwert zu Totalwert gibt den relativen Anteil eingebauten Substrates wieder. Mit der bekannten Menge unmarkierten Substrats kann somit die Menge insgesamt synthetisierter cDNA berechnet werden.

Der eingefrorene Ansatz wird wieder aufgetaut und auf 25 mM EDTA, 150 mM NaOAc gebracht. Nach zweimaliger Extraktion mit demselben Volumen Phenol/Chloroform (1:1) wird die wäßrige Phase zwei Mal mit Ether extrahiert.

Die Nukleinsäuren werden durch Zugabe desselben Volumens 4 M NH_4OAc und des fünffachen Volumens Ethanol 30 Minuten lang bei -70°C präzipitiert und anschließend bei 4°C 30 Minuten lang mit 8000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μl 1 mM Tris/ HCl pH 7.6, 0.1 mM EDTA aufgenommen.

3.4.1.2. Zweitstrangsynthese

Zweitstrangsynthesepuffer

20	mM Dithiothreitol
100	mM Tris/HCl pH 7.5
750	μM NAD^+
0.25	mg/ml Rinderserumalbumin
0.5	mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
30	mM MgCl_2
500	mM KCl
50	mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Es werden zusammengegeben :

50	μl	Erststrangprodukt
16	μl	Zweitstrangsynthesepuffer
1	μl	α - ^{32}P -dCTP (10 μCi)
2.25	μl	RNase H (4.5 U)
7	μl	DNA- Polymerase I (35 U)
5	μl	NAD^+ - abhängige DNA-Ligase (1 μg).

Der Ansatz wird 3 Stunden lang bei 14°C inkubiert, je zwei 1 μl - Aliquots werden nach zwei und drei Stunden entnommen. Anschließend wird die Inkubationstemperatur für eine weitere Stunde auf 22°C erhöht; in dieser Zeit werden je zwei 1 μl - Aliquots nach 45 und 60 Minuten entnommen. Alle Proben werden auf DE 81-Papier aufgegeben. Die Reaktion wird durch zehnminütiges Erhitzen auf 65°C beendet, hiernach wird der Ansatz auf Eis gestellt.

Von den je zwei zu einem Zeitpunkt entnommenen Aliquots wird eines vier Mal 5 Minuten in 0.5 M Na_2HPO_4 gewaschen. Die Radioaktivität aller Proben wird im Tritiumkanal in 5 ml Wasser szintillographisch gemessen.

Das Verhältnis von eingebauter Radioaktivität zu gesamter Radioaktivität ist ein Maß für den Anteil des insgesamt neu eingebauten Substratanteils; die Ausbeute an Zweitstrangprodukten kann auf diese Weise berechnet werden.-

Dem Ansatz werden nun 1 μl 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP und 10 Units T4- DNA-Polymerase zum Auffüllen versetzter Enden zugefügt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37°C wird der Ansatz auf 0.3 M NaOAc gebracht und zwei Mal mit derselben Menge Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Die wäßrige Phase wird zwei Mal mit Ether extrahiert und die cDNA durch Zugabe desselben Volumens 4 M NH_4OAc und des fünffachen Volumens Ethanol 30 Minuten lang bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation mit 8000 g bei 4°C für 30 Minuten wird das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und in 10 μl 1 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA aufgenommen.

3.4.2. Klonierung von cDNA in λ gt10

Bei dem verwendeten Klonierungsprotokoll wird die cDNA in die EcoRI- Erkennungsstelle des Phagen λ gt10 kloniert.

Das Protokoll gliedert sich in:

- den Schutz interner EcoRI- Stellen durch Methylierung
- das Ligieren von EcoRI- Linkern an die Enden der cDNA
- das Abbauen überschüssiger Linker mit EcoRI
- das Fraktionieren der cDNA unter gleichzeitiger Abtrennung freier Linker durch eine Gelelektrophorese
- das Ligieren der cDNA in die mit EcoRI geschnittenen Arme des Vektors
- das "in vitro- Packaging" rekombinanter λ gt10- Moleküle
- die Plattierung der cDNA- Bank.

3.4.2.1. Methylierung interner EcoRI- Stellen

Reagentien für diesen und die folgenden Klonierungsschritte werden dem " λ gt 10- Klonierungssystem" entnommen und entsprechend den Vorschlägen des Herstellers eingesetzt (Amersham, 1986).

Zur Methylierung interner EcoRI- Erkennungsstellen werden der synthetisierten doppelsträngigen cDNA 2 μ l S-Adenosylmethioninlösung und 4 μ l Methylasepuffer sowie 20 Units EcoRI- Methylase aus dem λ gt10- Klonierungssystem zugesetzt. Der Ansatz wird eine Stunde bei 37°C und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

3.4.2.2. Anfügen der Linker und EcoRI- Verdau

Der methylierten cDNA werden zugesetzt:

1	µg phosphorylierte EcoRI- Linker
3	µl Ligasepuffer
5	U T4 DNA- Ligase

Der Ansatz wird auf ein Volumen von 30 µl gebracht und über Nacht bei 15° inkubiert. Anschließend werden 10 µl EcoRI- Puffer und 120 Units EcoRI zugesetzt, der Ansatz wird auf ein Volumen von 100 µl gebracht und fünf Stunden lang bei 37°C inkubiert.

3.4.2.3. Fraktionierung der cDNA

Zur Abtrennung abgespaltener Linker und zur Größenfraktionierung der cDNA dient eine Elektrophorese durch ein 1 % - Agarosegel. Laufpuffer ist 0.09 M Tris, 0.09 M Bor-säure, 2.5 mM EDTA, 0.5 µg/ml Ethidiumbromid. Vor dem Auftrag werden die Proben zwei Minuten lang auf 70°C erhitzt. Anhand der Laufstrecken von doppelsträngigen DNA-Molekülen bekannter Größe werden Fraktionen der cDNA mit den folgenden Längen aus dem Gel isoliert:

0- 500	Nukleotide
500-1500	Nukleotide
>1500	Nukleotide.

Alle Fraktionen werden gegen Streifen von DE 81 -Papier elektrophoriert, die an entsprechender Stelle ins Gel eingelegt werden. Die Elution der DNA von den Papierstreifen erfolgt analog zu 3.6.5.

Die cDNA- Fraktion mit Molekülen von mehr als 1500 Nukleotiden Länge wird anschließend in die EcoRI- Erkennungsstelle des Phagen λ gt10 kloniert.

3.4.2.4. Ligieren von cDNA in λ gt10- Vektorarme

Zu einem Ligationsansatz werden zusammengegeben:

1	μ g	λ gt10- Vektorarme (EcoRI- verdaut)
6	μ l	cDNA (Moleküle über 1500 Nukleotide Länge, 30 bzw. 50 ng)
1	μ l	Ligasepuffer
1	μ l	2.5 Units/ μ l T4 DNA-Ligase

Der Ansatz wird 20 Stunden bei 14°C inkubiert, anschließend auf 100 μ l Volumen und 0.3 M NaOAc gebracht. Durch Zugabe des zweieinhalbfachen Volumens an Ethanol wird die DNA gefällt, nach 30 Minuten Inkubation bei -70°C abzentrifugiert (4°C, 15 Minuten, 8000 g), mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und in 2.5 μ l 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA aufgenommen.

3.4.2.5. in-vitro-"Packaging" der ligierten DNA

SM-Puffer

0.1 M	NaCl
5 mM	Tris/HCl pH 7.5
2 %	Gelatine
8 mM	MgSO ₄

Verwendet werden "Packaging- Extrakte" zweier verschiedener Hersteller, die jeweils nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt werden. Bei Verwendung der Extrak-

te aus dem Amersham "λgt10 Klonierungssystem" werden je ein Extrakt A und B auf Eis aufgetaut. 10 µl von Extrakt A werden zum Ligationsansatz gegeben, unmittelbar danach werden 15 µl eines Extrakts B zum Ansatz gegeben. Der Ansatz wird zwei Stunden bei 21°C inkubiert.

Bei Verwendung des "Packagene"- Systems (Promega Biotech.) wird ein "Packaging- Extrakt" aufgetaut, zum Ligationsansatz gegeben und ebenfalls 2 h bei 21°C inkubiert. Nach dieser Zeit werden 500 µl SM- Puffer und 10 µl Chloroform zugesetzt und der Ansatz wird kräftig durchgemischt. Die λgt10- cDNA- Bank ist in diesem Zustand bei 4°C lagerbar. Zur Titerbestimmung werden verdünnte Aliquots der jeweiligen cDNA- Bank ausplattiert (siehe folgender Abschnitt).

3.4.2.6. Plattieren von λgt10-Phagen

L-Agarplatten

1	%	Trypton
0.5	%	Hefeextrakt
1	%	NaCl
1.5	%	Agar

LB-Medium

1	%	Trypton
0.5	%	Hefeextrakt
1	%	NaCl

Topagar

1	%	Trypton
0.5	%	Hefeextrakt
0.5	%	NaCl
0.25	%	MgSO ₄
0.7	%	Agaröse

Escherichia coli- Zellen vom Stamm NM 514 werden auf eine L- Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wird in 10 ml LB-Medium unter Zusatz von 0.4 % steril filtrierter Maltose überführt und unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Übernachtskultur wird in 50 ml LB-Medium überführt, die Kultur wird auf 0.4 % Maltose gebracht und so lange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine Optische Dichte bei 600 nm von 0.5 erreicht ist. Die Kultur wird auf Eis gekühlt, die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C mit 5000 g für 10 Minuten abgetrennt und sodann in 15 ml kalter 10 mM MgSO₄- Lösung resuspendiert.

Zu jeweils 100 µl der auf diese Weise kompetent gemachten Zellen wird die zu transformierende λgt10- DNA in ebenfalls 100 µl gegeben. Es wird 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 4 ml Topagar hinzugegeben, der auf 45°C vorgewärmt ist. Die Mischung wird auf L- Agarplatten ausgegossen. Die Platten werden etwa 8 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Zeit erscheinen die Phagen- Plaques.

3.4.3. Replizierung von cDNA- Banken

Auf die Agarplatten mit rekombinanten λgt10- Plaques wird eine Transferfolie gelegt und 90 Sekunden auf der Platte belassen. Anschließend wird die an den Filter gebundene DNA 5 Minuten in 0.5 N NaOH denaturiert, der Filter wird

zweimal 5 Minuten in 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 und einmal 5 Minuten in 0.3 M NaCl, 20 mM NaH_2PO_4 , 2 mM EDTA neutralisiert, 30 Minuten lang getrocknet und 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum gebacken. Von jeder Platte werden zwei Parallelreplica abgenommen.-

Von Agarplatten mit Bakterienkolonien, die ein rekombinantes Plasmid tragen, werden diese Kolonien zunächst mit Hilfe einer autoklavierten Nylonfolie abgenommen ("Masterreplicon"). Die Kolonien werden anschließend durch Druck (60 Sekunden, 2 kg) auf bis zu vier weitere Filter überimpft. Alle Filter werden für 12 Stunden auf Agarplatten gelegt, die ein geeignetes Antibiotikum enthalten.

Anschließend werden die Masterreplica auf 4°C gelagert, die weiteren Replica werden für 12 weitere Stunden zur Amplifizierung auf eine Agarplatte überführt, die 340 µg/ml Chloramphenicol enthält. Nach dieser Zeit werden die Filter zur Denaturierung der DNA 5 Minuten in Kontakt mit 0.5 N NaOH gebracht, sodann zur Neutralisierung zweimal 5 Minuten mit 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 behandelt.

Zum Verdau übriggebliebener bakterieller Reste dient eine dreißigminütige Inkubation in 0.1 mg/ml Proteinase K, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 % SDS. Anschließend werden die Filter noch einmal 30 Minuten in 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 geschüttelt, getrocknet und 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum gebacken.

3.5. Hybridisierungsmethoden

3.5.1. Oligonukleotide

Als spezifische Hybridisierungsproben für mRNA oder daraus synthetisierte cDNA können Oligonukleotide dienen, die komplementär zu bekannten Abschnitten der gesuchten Sequenz sind.

Der Entwurf der einzelnen Oligonukleotidproben und die Parameter des jeweiligen Hybridisierungsexperiments werden im Abschnitt "Ergebnisse" dieser Arbeit im einzelnen beschrieben.

3.5.2. Synthese und Aufreinigung von Oligonukleotiden

Die Proben A1, A2, A3, B1 und B2 wurden im Labor von Prof. Dr. Gaassen (Univ. Darmstadt) synthetisiert und voll aufgereinigt geliefert. Sie konnten direkt in der Polynukleotidkinasereaktion eingesetzt werden.

Die Proben A4, A5, B3, B4 und B5 wurden auf einem automatischen Synthesizer (Applied Biosystems, Modell 380 A) im Labor von Prof. Dr. Kück (Institut für Allg. Botanik der Ruhr-Universität Bochum) nach der Phosphoamiditmethode synthetisiert und selbst aufgereinigt.

Die Aufreinigung erfolgte nach den Vorschlägen der Firma Applied Biosystems (1984).

Zunächst werden die Oligonukleotide mit drei Mal 2 ml konzentriertem Ammoniak je 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf diese Weise von der Synthesesäule abge-

trennt. Anschließend werden die Oligonukleotide im konzentrierten Ammoniak über Nacht bei 55⁰C inkubiert; der Ammoniak wird eingedampft. Die weitere Aufreinigung erfolgt durch HPLC oder präparative Polyacrylamidgelelektrophorese.

3.5.2.1. Aufreinigung durch HPLC

Dieser Weg wird bei den Oligonukleotiden A4, B3 und B4 eingeschlagen. Die Säule (Vydac RP C-18) wird mit 5 μ Mol Hypersil (Fa.Bischoff, Leonberg) gefüllt. Der Lauf erfolgt bei 50⁰C in einem Acetonitrilgradienten von 20 % bis 80 %, die Flußrate ist 1 ml/min. Es werden 10 % der im 1 μ Mol- Maßstab synthetisierten Oligonukleotide eingesetzt. Der Nachweis der DNA erfolgt bei 256 nm. Fraktionen, die das Oligonukleotidgemisch enthalten, werden vereinigt und zur Trockene gebracht. Zur Detritylierung werden sie drei Mal mit je 150 μ l 80% Essigsäure versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zur Trockene gebracht. Anschließend werden sie in destilliertem Wasser aufgenommen; die Endkonzentration beträgt 40 pMol/ μ l (für A4 und B3) bzw. 32 pMol/ μ l (für B4).

3.5.2.2. Aufreinigung durch präparative Gelelektrophorese

Dieser Weg wird bei den Oligonukleotiden A5 und B5 eingeschlagen. Die DNA wird in einer Konzentration von 0.37

nMol/ μ l in 98% Formamid/ 10 mM EDTA aufgenommen. 15 nMole werden über ein 12 %- Polyacrylamidgel der Dicke 1.5 mm aufgetrennt. Das Gel läuft 30 Minuten bei 400 V vor; anschließend erfolgt die Auftrennung etwa 8 Stunden lang bei 450 V. Das Gel wird von den Gelplatten gelöst und 30 Minuten lang in 0.5 μ g/ ml Ethidiumbromid, 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA angefärbt. Erkennbar werden bei 254 nm eine intensive Bande, die dem Endsyntheseprodukt entspricht sowie eine Reihe schneller wandernder Banden, die verkürzten Oligonukleotiden entsprechen, welche durch vorzeitige Beendigung der Synthese entstanden sind. Die Hauptbande wird ausgeschnitten und mechanisch durch dreimalige Passage durch eine Injektionsspritze zerkleinert. Die Gelstücke werden zur Elution der DNA über Nacht mit 2 ml 500 mM NH_4OAc , 10 mM Magnesiumacetat, 0.1 % SDS, 0.1 mM EDTA bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Gemisch durch ein Glasfaserplättchen filtriert und das Filtrat vier Mal mit n-Butanol extrahiert. Die letzte wäßrige Phase wird zur Fällung der Oligonukleotide auf 0.3 M NaOAc gebracht und mit der dreifachen Menge Ethanol versetzt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei -20°C wird die DNA abzentrifugiert (8000 g, 4°C, 15 Minuten) und in destilliertem Wasser aufgenommen. Die Endkonzentration beträgt 7 pMol/ μ l.

3.5.3. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Markierungspuffer

750	mM	Tris/HCl	pH 7.5
150	mM	MgCl ₂	

Waschpuffer

0.2	M	NaCl	
10	mM	Tris/HCl	pH 7.6
1	mM	EDTA	

Elutionspuffer

0.5	M	NaCl	
10	mM	Tris/HCl	pH 7.6
1	mM	EDTA	

Zu einem Markierungsansatz werden zusammengegeben:

<10	µl		γ- ³² P- ATP (100 µCi)
1	µl		Markierungspuffer
1	µl	1 %	β- Mercaptoethanol
3	µl		Oligonukleotid (250 bis 500 ng)
0.6	µl	10 U/µl	T4- Polynukleotidkinase

(Das γ-³²P- ATP wurde nach der Methode von Walseth et al. (1979) präpariert.)

Der Ansatz wird auf ein Volumen von 15 µl gebracht und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wird 1 µl entnommen und mit 9 µl 25 mM EDTA verdünnt. Hiervon werden vier Mal 1.5 µl auf DE81- Papier aufgetropft. Zwei dieser Proben werden viermal 5 Minuten lang in Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Radioaktivität aller Proben wird sodann in 5 ml Wasser im Tritiumkanal eines Szintillationszählers gemessen. Der Einbau der eingesetzten Radioaktivität liegt zwischen 20 %

und 80 %.

Die Abtrennung nicht eingebauten Substrats erfolgt entweder durch DEAE/Cellulose- Chromatographie oder durch Ethanol-fällung der markierten DNA.

Bei der DEAE/Cellulose- Chromatographie wird der Ansatz zu 100 µl einer DEAE/Cellulose-Suspension (etwa 50% in Waschpuffer) gegeben und zwei Mal mit 0.5 ml Waschpuffer gewaschen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wird die Matrix durch Zentrifugation vom Waschpuffer getrennt. Anschließend wird die markierte DNA durch viermalige Inkubation mit 50 µl Elutionspuffer von der Matrix eluiert. Das Eluat kann direkt in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden.

Die Ethanol-fällung markierter Oligonukleotide kommt nur für die langen Proben A5 und B5 in Frage. Hierbei werden dem Markierungsansatz 2 µg tRNA als Carrier zugefügt. Anschließend wird der Ansatz auf 0.3 M NaOAc gebracht und die Nukleinsäuren werden durch Zugabe der dreifachen Menge Ethanol und Inkubation bei -70°C für 30 Minuten gefällt. Nach Abzentrifugation (8000g, 4°C , 15 Minuten) wird das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl destilliertem Wasser wiederaufgenommen. Die Ausbeute der Reinigungsprozeduren inbezug auf die vorher ermittelte insgesamt eingebaute Radioaktivität beträgt etwa 50% .

3.5.4. Hybridisierung von Oligonukleotiden mit immobilisierten Nukleinsäuren

Denhardt's Lösung (50-fach konzentriert)

10	mg/ml	Ficoll
10	mg/ml	Polyvinylpyrrolidon
10	mg/ml	Rinderserumalbumin

SSPE (20- fach konzentriert)

3	M	NaCl
20	mM	EDTA
0.2	M	NaH ₂ PO ₄

pH 7.4

Standardhybridisierungspuffer für das Screening

		6- fach konzentrierte SSPE- Lösung
		5- fach konzentrierte Denhardt- Lösung
0.1	%	SDS
100	µg/ml	gekochte , fragmentierte Herings- DNA

Formamidhaltiger Hybridisierungspuffer für das Screening

dieselbe Zusammensetzung wie der Standardhybridisierungspuffer, jedoch zusätzlich:

20	%	Formamid
----	---	----------

Hybridisierungspuffer für "Northern Blots"

dieselbe Zusammensetzung wie der jeweilige Hybridisierungspuffer für das "Screening", jedoch zusätzlich:

50	µg/ml	Hefe tRNA
50	µg/ml	poly(A); teilweise hydrolysiert durch zweiminütiges Kochen

Waschpuffer I

0.3	M	NaCl
0.03	M	Natriumcitrat
0.1	%	SDS
		pH 7.0

Waschpuffer II

30	mM	NaCl
3	mM	Natriumcitrat
0.1	%	SDS
pH 7.0		

Waschpuffer III

3	M	Tetramethylammoniumchlorid
50	mM	Tris/HCl pH 7.6
2	mM	EDTA
0.1	%	SDS

Die Transferfolie mit den immobilisierten Nukleinsäuren wird zunächst über Nacht unter geeigneten Temperaturbedingungen im Hybridisierungspuffer inkubiert (Prähybridisierung). Hierbei wird für die Proben A5 und B5 der formamidhaltige Hybridisierungspuffer gewählt.

Anschließend werden die markierten Oligonukleotide 5 Minuten gekocht und zugesetzt (Konzentration $> 10^6$ cpm/ml).

Unter wiederholtem Durchmischen wird unter denselben Bedingungen erneut inkubiert (Hybridisierung).

Unspezifisch gebundene Radioaktivität wird vom Filter abgewaschen.

Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen (Puffer und Temperaturen) werden im einzelnen im Ergebnisteil diskutiert.

3.5.5. Markierung doppelsträngiger DNA

3.5.5.1. Markierung nach Feinberg und Vogelstein

Die Methode der DNA Markierung nach Feinberg und Vogelstein (1983) beruht auf der Hybridisierung einer Mischung

von Hexanukleotiden aller möglichen Zusammensetzungen an die zu markierende DNA. Der komplementäre Strang wird mit Hilfe dieser Hexanukleotide als Primer mit Hilfe der Klenow-Polymerase synthetisiert. Zu einem Markierungsansatz werden aus dem "Random Primed DNA Labeling Kit" von Boehringer zusammengegeben:

25	ng		denaturierte DNA (3 Minuten gekocht)
2	µl		Hexanukleotidgemisch
1	µl	0.5 mM	dATP
1	µl	0.5 mM	dGTP
1	µl	0.5 mM	dTTP
50	µCi	3Ci/µMol	(α - ³² P)dCTP
1	U		Klenow Enzym

Der Ansatz wird auf ein Volumen von 20 µl gebracht und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA beendet. 1 µl wird dem Ansatz entnommen und mit 3 µl 0.2 M EDTA verdünnt; aus dieser Verdünnung werden viermal 1 µl auf DE 81- Papier aufgetropft. Zwei der Proben werden viermal 5 Minuten in 0.5 M Na₂HPO₄ gewaschen. Anschließend wird die Radioaktivität aller Proben in 5 ml Wasser im Tritiumkanal szintillometrisch gemessen. Der Anteil eingebauter Radioaktivität liegt in der Regel über 70%.

Dem Ansatz werden 10 µl 3 M NaOAc, 70 µl Wasser und 1 µg tRNA zugefügt. Anschließend erfolgt eine wiederholte Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1). Die DNA wird sodann durch Zugabe derselben Menge 4 M NH₄OAc und der dreifachen Menge Ethanol bei -70°C gefällt, und anschließend 15 Minuten lang bei 4°C mit 8000 g abzentrifu-

giert. Das Pellet wird mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μ l Wasser wiederaufgenommen.

3.5.5.2. "Nick-Translation"

Es werden zusammengegeben:

100	ng		doppelsträngige DNA
4	μ l	je 1 mM	dATP, dGTP, dTTP
4	μ l	0.1 mM	Dithiothreitol
2	μ l	1 M	Tris/HCl pH 7.5
2	μ l	1 mg/ml	Rinderserumalbumin
4	μ l	0.1 mM	MgCl ₂
100	μ Ci	3 Ci/ μ Mol	α - ³² P-dCTP
2	μ l	0.5 ug/ml	DNase I (in 50 mM Tris/HCl pH 7.5)

Der Ansatz wird auf 40 μ l gebracht und 45 Minuten bei 15°C inkubiert. Anschließend werden 7.5 U DNA- Polymerase I hinzugefügt; die Inkubation wird fortgesetzt. Nach 30 Minuten wird der Anteil eingebauter Radioaktivität bestimmt (aus zweimal 1 μ l des Ansatzes, Verfahren wie unter 3.5.5.1.). Wünschenswert ist ein Einbau von etwa 30%. Die Aufreinigung (Phenolextraktion) und die Ethanol-fällung erfolgen wie unter 3.5.5.1. beschrieben.

3.5.6. Hybridisierungsbedingungen mit markierter doppelsträngiger DNA als Probe

Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen in dem unter 3.5.4. beschriebenen Standardhybridisierungspuffer für das Screening unter Hinzufügung von 50 % Formamid. Beide Schritte werden bei 40°C für mehr als 12 Stunden

durchgeführt. Die Konzentration der Probe ist größer als $5 \cdot 10^5$ cpm/ml; vor der Hybridisierung wird die Probe 5 Minuten gekocht. Die Filter werden in 0.15 M NaCl, 0.015 M Natriumcitrat, 0.1 % SDS 30 Minuten bei 60°C gewaschen.

3.6. Präparation klonierter DNA

3.6.1. Präparation von Plasmiden (kleiner Maßstab)

Die Präparation von Plasmiden erfolgt nach der von Maniatis (1982) angegebenen Methode. 3 ml Medium mit entsprechendem Antibiotikum werden mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden mit 8000 g eine Minute lang abzentrifugiert und dann in 100 µl 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert. Nach 5 Minuten werden 200 µl einer frisch zubereiteten Lösung von 0.2 N NaOH, 1 % SDS zugegeben. Es wird durch dreimaliges Kippen gemischt. Nach viertelstündiger Inkubation auf Eis werden 150 µl 5 M KOAc (pH 4.8) zugefügt und der Ansatz wird auf dem Kopf stehend vorsichtig durchgemischt (Vortex). Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wird 3 Minuten lang bei 0°C mit 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wird zwei Mal mit derselben Menge Phenol/ Chloroform (1:1) extrahiert. Die letzte wässrige Phase wird drei Mal mit 400 µl Ether extrahiert. Anschließend wird die DNA durch Zufügen der doppelten Menge Ethanol und Inkubation bei -70°C für 30 Minuten gefällt. Nach Zentrifugation bei

4°C für 15 Minuten mit 8000 g wird das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 24 µl destillierten Wassers aufgenommen. Es wird 0.5 µl RNase A (1 mg/ml) zugefügt und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Plasmid- DNA kann sofort oder nach Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym auf einem 1% Agarosegel in 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, 0.5 µg/ml Ethidiumbromid analysiert werden.

3.6.2. Präparation von Plasmiden (großer Maßstab)

850 ml des geeigneten Mediums werden in einem 5 l- Kolben autoklaviert. Nach Abkühlen wird die empfohlene Menge des entsprechenden Antibiotikums zugefügt und das Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft. Unter Schütteln wird bei 37°C so lang inkubiert, bis bei 550 nm eine Extinktion von 0.5 erreicht ist. Dann wird die Kultur auf 340 µg/ml Chloramphenicol gebracht (Amplifikation des Plasmids) und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Zeit werden die Zellen abzentrifugiert (5000 g, 4°C, 20 Minuten) und in 10 ml 50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA unter Hinzufügung von wenig festem Lysozym wiederaufgenommen. Es wird 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden 30 ml frisch zubereiteter 0.2 N NaOH, 1 % SDS zugesetzt, es wird gemischt und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es werden 22.5 ml 5 M KOAc (pH 4.8) zugesetzt. Nach erneuter Inkubation auf

Eis für 45 Minuten werden Zelltrümmer, chromosomale DNA und das K-SDS- Präzipitat bei 4°C 15 Minuten lang mit 15000 g abzentrifugiert. Dem Überstand werden 45 ml Isopropanol zugefügt und der Ansatz wird 45 Minuten auf Raumtemperatur zur Fällung der Plasmid- DNA stehengelassen. Die DNA wird bei Raumtemperatur 15 Minuten lang mit 15000 g abzentrifugiert; das Pellet wird im Stickstoffstrom getrocknet und mechanisch zerkleinert. Das Pellet wird in 10 ml CsCl- Lösung (100 g CsCl + 100 ml 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) resuspendiert; zur Resuspension wird eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für eine Stunde bei -20°C werden feste Bestandteile 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 25000 g abzentrifugiert. Dem Überstand werden 0.6 ml einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung zugefügt und die Lösung wird 40 Stunden lang bei 20°C mit 80000 g zentrifugiert. Nach dieser Zeit erscheinen unter UV- Licht in der Mitte des Gradienten zwei Banden, wobei die obere Bande verbliebener chromosomaler, die untere Bande der Plasmid- DNA entspricht.

Diese untere Bande wird dem Gradienten entnommen und das Material wird drei Mal mit derselben Menge Isopropanol extrahiert. Hiernach wird die wäßrige Phase zur Entfernung des CsCl 3 h lang gegen 2 l 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA dialysiert. Anschließend wird die Lösung auf 0.3 M NaOAc gebracht und die DNA durch Zugabe der zweieinhalbfachen Menge Ethanol gefällt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei -70°C wird die DNA 30 Minuten lang bei 4°C

mit 8000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl 1 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA aufgenommen. Die Menge an gereinigter Plasmid- DNA wird spektrophotometrisch bestimmt.

3.6.3. Präparation von λ gt10- DNA (kleiner Maßstab)

Die Präparation von λ gt10- DNA in kleinem Maßstab erfolgt nach der von Amersham (1986) angegebenen Methode.

PEG-Lösung

2	M	NaCl
20	%	Polyethylenglykol
5	mM	Tris/HCl pH 7.5
2	%	Gelatine
8	mM	MgSO ₄

Ein interessierender Plaque wird ausgestochen und in 0.5 ml kompetenter NM 514 -Zellen gegeben (vgl. 3.4.2.6.). Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 5 ml LB- Medium (siehe 3.4.2.6.) und 100 µl 1 M CaCl₂ hinzugegeben und die Kultur wird bei 37°C 4 h lang unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit werden 100 µl Chloroform zugefügt und es wird weitere 5 Minuten lang geschüttelt. Zelltrümmer werden durch zehnminütige Zentrifugation mit 5000 g abgetrennt. Zu 4 ml des Überstands werden 4 ml PEG- Lösung gegeben und die Phagenpartikel werden eine Stunde auf Eis gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation mit 5000 g wird das Pellet von zurückgebliebenen Spuren PEG befreit und in 750 µl LB- Medium

wiederaufgenommen. Es wird DE52-Cellulose in LB- Medium (etwa 600 mg DE52-Cellulose in einem Gesamtvolumen von 750 μ l) zugefügt und durch Kippen gemischt. Die DEAE-Cellulose bindet freie Nukleinsäuren und wird durch Zentrifugation (5000 g, 5 Minuten) abgetrennt. Zu 750 μ l des Überstandes werden 13 μ l einer 0.1 mg/ml Proteinase K- Lösung und 16 μ l einer 20 % SDS- Lösung gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden 130 μ l 3 M KOAc hinzugegeben. Es bildet sich ein Präzipitat, das sich im Laufe der folgenden zehnminütigen Inkubation bei 88°C wieder auflöst. Der Ansatz wird auf Eis gestellt und das sich neu bildende Präzipitat wird durch Zentrifugieren mit 5000 g für 10 Minuten abgetrennt.

Der Überstand wird mit derselben Menge Isopropanol versetzt. Nach 10 Minuten bei -70°C wird die ausgefallene DNA 15 Minuten lang mit 8000 g bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μ l 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA aufgenommen. Die Phagen-DNA kann sofort oder nach Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym auf einem 1 % - Agarosegel in 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid analysiert werden.

3.6.4. Präparation von λ gt10- DNA (großer Maßstab)

Die Aufreinigung von Phagen- DNA im großen Maßstab erfolgt nach der Vorschrift von Maniatis (1982). Zunächst wird ein interessierender Plaque aus einer Agarplatte

ausgestochen, in 1 ml SM- Puffer (vgl. 3.4.2.5.) gegeben und nach Hinzufügen von wenig Chloroform und kräftigem Schütteln bei 4°C aufbewahrt. Durch Ausplattieren von geeignet verdünnten Aliquots dieses Phagenstamms wird der Titer bestimmt.

10 ml LB- Medium mit 200 µl 20 % Maltose werden mit einer Kolonie NM 514 -Zellen beimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wird anschließend eine große Kultur (800 ml LB-Medium mit 16 ml 20% Maltose) beimpft. Diese wird unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis die Extinktion bei 550 nm einen Wert von 0.25 erreicht. Die Zellen werden dann durch Zentrifugation mit 5000 g für 10 Minuten abgetrennt und in 200 ml 10 mM MgSO₄ wieder aufgenommen.

Zu je 50 ml dieser Kultur kompetenter Zellen werden 3.5×10^9 Phagenpartikel gegeben; dies entspricht einer "multiplicity of infection" von 0.1 . Nach dreißig Minuten bei Raumtemperatur werden 450 ml LB- Medium und 2.5 ml 1 M CaCl₂ hinzugefügt und die Kultur bei 37°C unter Schütteln bis zur Lyse inkubiert (etwa 5 Stunden lang). Es werden 10 ml Chloroform zugefügt und die Inkubation wird für 30 Minuten fortgesetzt.

Zum Verdau bakterieller Nukleinsäuren wird die Kultur auf 1 µg/ml RNase A und 1 µg/ml DNase I gebracht und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 27 g NaCl zugefügt und die Kultur wird eine Stunde auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation mit 6000 g bei 4°C für

15 Minuten werden im Überstand bei 37°C 50 g festes Polyethylenglykol gelöst; anschließend wird der Ansatz erneut eine Stunde auf Eis gestellt. Die Phagenpartikel werden 10 Minuten lang mit 8000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml SM- Puffer aufgenommen und drei Mal mit derselben Menge Chloroform extrahiert. Die letzte wäßrige Phase wird mit 0.75 g CsCl pro ml Suspension versetzt und 12 Stunden lang in der Ultrazentrifuge bei 20°C mit 80000 g zentrifugiert. Nach dieser Zeit erscheint im CsCl- Gradienten unter Tageslicht eine weißliche Bande (Lichtstreuung durch Phagenpartikel). Diese wird dem Gradienten entnommen, mit CsCl-haltigen SM- Puffer (0.75 g CsCl pro ml SM) auf ein Volumen von 4 ml gebracht und die CsCl- Dichtegradientenzentrifugation wird wiederholt.

Die Phagenbande wird erneut entnommen und das Material wird zweimal eine Stunde gegen 10 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂ dialysiert, um das CsCl zu entfernen. Anschließend wird die Suspension mit Dialysepuffer auf ein Volumen von 800 µl gebracht. 80 µl 50 mM EDTA, 23 µl 1 mg/ml Proteinase K und 9 µl 20% SDS-Lösung werden zugefügt und es wird eine Stunde lang bei 65°C zum Verdau der Phagenhüllen inkubiert. Hiernach wird die Lösung zweimal mit derselben Menge Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Die letzte wäßrige Phase wird auf 0.3 M NaOAc gebracht. Die Phagen- DNA wird durch Zugabe der zweieinhalbfachen Menge Ethanol gefällt. Nach Inkubation bei -70°C für 30 Minuten wird die DNA abzentrifugiert (8000g,

15 Minuten, 4°C). Das Pellet wird mit 1ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl 1 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA aufgenommen. Die Menge an aufgereinigter Phagen- DNA wird spektrophotometrisch bestimmt.

3.6.5. Isolierung von Restriktionsfragmenten

Waschpuffer

10	mM	Tris/HCl pH 7.6
1	mM	EDTA
0.1	M	LiCl

Elutionspuffer

10	mM	Tris/HCl pH 7.6
1	mM	EDTA
1	M	LiCl
20	%	Ethanol

DNA wird mit dem interessierenden Restriktionsenzym unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verdaut. Die Restriktionsfragmente werden in einem Agarosegel aufgetrennt. Laufpuffer ist 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, 0.5 µg/ml Ethidiumbromid. Unter UV- Licht werden ins Gel vor die zu isolierenden Banden Schnitte gelegt. In diese Schnitte wird ein Stück DE81- Papier plaziert. Die DNA wird gegen diesen Papierstreifen eluiert. Der Streifen wird viermal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die DNA mit sechsmal 50 µl Elutionspuffer vom Papier eluiert. Die DNA-Lösung wird auf 0.3 M NaOAc gebracht und mit der zweieinhalbfachen Menge Ethanol versetzt. Nach Inkubation bei -70°C für 30

Minuten wird die gefällte DNA abzentrifugiert (15 Minuten, 8000 g, 4°C), mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Das Endvolumen beträgt in der Regel 100 ng/µl .

3.7 Methoden zur Sequenzierung klonierter DNA

Die Sequenzierung erfolgt nach der Strangabbruchmethode von Sanger (1977). Hierbei wird der komplementäre Strang zu einer einzelsträngigen DNA unter Einbau radioaktiven Substrats synthetisiert. Diese Synthese wird an definierten Stellen durch Einbau von Dideoxynukleotidanaloga abgebrochen.

Das Sequenzierungsprotokoll gliedert sich in die Schritte:

- Subklonierung der zu sequenzierenden DNA in den Phagen M13
- Präparation einzelsträngiger rekombinanter M13-Phagen- DNA
- Sequenzierungsreaktion und
- Gelelektrophorese.

3.7.1. Subklonierung in M13 Phagen

SOB-Platten

2	%	Trypton
0.5	%	Hefeextrakt
10	mM	NaCl
2.5	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄
1.2	%	Agar

H-Platten

1	%	Trypton
0.8	%	NaCl
1.2	%	Agar

H-Topagar

1	%	Trypton
0.8	%	NaCl
0.8	%	Agar

2xTY-Medium

1.6	%	Trypton
1	%	Hefeextrakt
0.5	%	NaCl

PEG/NaCl-Lösung

20	%	Polyethylenglykol
2.5	M	NaCl

Doppelsträngige Phagen DNA der M13 Stämme mp8, mp18 und mp19 wird mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten, phenolextrahiert, ethanolgefällt und in einer Endkonzentration von 20 ng/µl wiederaufgenommen.

Zu sequenzierende DNA wird mit denselben Restriktionsenzymen gespalten wie der Vektor, die Restriktionsfragmente werden isoliert wie unter 3.6.5. beschrieben.

Zu Ligation der DNA in Vektormoleküle werden zusammengegeben:

1	µl	20 ng/µl	geschnittener Vektor
5	µl	20 ng/µl	geschnittene DNA
1	µl	10- fach	konzentrierter Ligasepuffer
		(660 mM	Tris/HCl pH 7.6, 66 mM MgCl ₂)
1	µl	10 mM	ATP
1	µl	50 mM	Dithiothreitol
1	U		T4 DNA-Ligase

Der Ansatz wird über Nacht inkubiert. Bei glatten Enden wird eine Inkubationstemperatur von 4°C , bei versetzten Enden eine von 14°C gewählt.

E.coli Zellen des Stamms JM 101 (für M13mp8) oder JM 103(für M13 mp18 und mp19) werden auf eine SOB- Platte ausgestrichen. 50 ml 2xTY- Medium werden mit einer Kolonie dieses Ausstrichs beimpft und unter Schütteln bei 37°C solange inkubiert, bis bei 550 nm eine Optische Dichte von 0.3 erreicht ist. Die Zellen werden 7 Minuten lang mit 6000 g abzentrifugiert und in 25 ml 50 mM eiskalter CaCl_2 Lösung wiederaufgenommen. Nach 20 Minuten auf Eis werden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 5 ml 50 mM CaCl_2 aufgenommen.

Zu je 300 μl dieser kompetenten Zellen wird nun ein Ligationsansatz gegeben. Es wird eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgt eine Inkubation von 3 Minuten Länge bei 42°C (Hitzeschock). Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis werden 200 μl einer logarithmischen Kultur des entsprechenden E.coli-Stamms, 40 μl einer 2 % X-Gal- Lösung und 40 μl einer 100 mM IPTG- Lösung zugefügt.

Der Transformationsansatz wird mit 3 ml H- Topagar (42°C) auf warme H- Platten plattiert. Nach 15- 20 Stunden erscheinen im Bakterienrasen weiße und blaue Plaques.

3.7.2. Präparation von einzelsträngiger rekombinanter M13- Phagen- DNA

Eine E.coli JM 101 oder JM 103- Übernachtskultur wird 1:100 mit 2xTY- Medium verdünnt. Je 1.8 ml dieser Verdünnung werden mit einem weißen Plaque angeimpft und fünf Stunden lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Zellen 5 Minuten lang mit 8000 g abgetrennt. Der Überstand wird eine Minute rezentrifugiert, um alle Zellen zu entfernen. Anschließend werden 200 µl der PEG/NaCl- Lösung hinzugefügt. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wird die ausgefallene DNA 15 Minuten lang mit 8000g abzentrifugiert. Aus dem Gefäß werden sorgfältig alle PEG- Spuren entfernt. Sodann werden 100 µl 10 mM Tris/HCl pH8.0, 1 mM EDTA zugefügt und das Pellet wird hierin suspendiert. Die Lösung wird zweimal mit derselben Menge Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, ethanolgefällt und in 25 µl Wasser wiederaufgenommen. 2 µl der gereinigten DNA werden auf einem 0.7 % Agarosegel auf ihre Reinheit überprüft. Zur Sequenzierung werden M13- Präparationen mit Inserts gegenläufiger Orientierung benötigt. Zur Analyse der Orientierung des Inserts in der einzelsträngigen DNA werden zusammengegeben:

2	µl	einzelsträngige M13 -DNA Präp. A
2	µl	einzelsträngige M13- DNA Präp. B
1.7	µl	20-fach konz. SSPE (siehe 3.5.4.)

Nach Inkubation für eine Stunde bei 65°C wird der Hybri-

disierungsansatz auf einem 0.7%-Agarosegel analysiert. Besitzen die Inserts der Präparationen A und B entgegengesetzte Orientierung, erscheint im Gel eine deutlich verlangsamt wandernde Bande im Vergleich zur reinen M13-Einzelstrangpräparation, die auf der Hybridisierung der beiden Inserts miteinander beruht.

3.7.3. Sequenzierungsreaktion und Gelelektrophorese

Zum Hybridisieren mit dem Primer (17-mer aus dem M13-Sequenzierungssystem) werden zusammengegeben:

10	µl	einzelsträngige M13-DNA
1.5	µl	1.2 ug/ml M13- Sequenzierungsprimer(17mer) .
2	µl	100 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM MgCl ₂

Es wird eine Stunde bei 57°C inkubiert. Anschließend werden hinzugefügt:

1	µl	(α - ³⁵ S)-dATP (10 µCi, >400 Ci/mMol)
1	µl	100 mM Dithiothreitol
1	U	Klenow- Enzym

Der Ansatz wird geviertelt und je ein Viertel zu je 2 µl der vier verschiedenen Reaktionsmixe gegeben. Diese haben folgende Zusammensetzung (in µM):

	dCTP	dGTP	dTTP	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP
A-Mix	63	63	63	100	0	0	0
C-Mix	19	77	77	0	500	0	0
G-Mix	77	4	77	0	0	175	0
T-Mix	77	77	4	0	0	0	500

Es wird 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann werden 2 μ l 0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dGTP, 0.5 mM dTTP ("Chase") zugefügt und die Inkubation wird für weitere 15 Minuten fortgesetzt. Durch Zufügen von 4 μ l 98 % Formamid, 20 mM EDTA, 1 mg/ml Xylencyanol, 1 mg/ml Bromphenolblau wird die Reaktion beendet. Je 2.2 μ l einer jeden einzelnen Reaktion werden vereinigt. Das restliche Volumen der Reaktionsansätze wird geteilt.

Die beiden das Gel umschließenden Glasplatten werden vor Gießen des Gels mit unterschiedlichen Silanen behandelt. Die Platte, die sich vom Gel lösen soll, wird mit 5 ml 2% Dimethyldichlorosilan in Chloroform behandelt. Nach 10 Minuten wird überschüssiges Silan mit Wasser entfernt und die Platte getrocknet.

Die Platte, an die das Gel gebunden werden soll, wird mit 5 ml 0.3 % γ -Metacryloxypropantrimethoxysilan in 99.7 % Ethanol, 0.3 % Essigsäure behandelt. Nach drei Minuten wird überschüssiges Silan mit reinem Ethanol entfernt und die Platte getrocknet.

Das Gel hat die Dimensionen 400x200x0.2 mm.

Pro Gel werden angesetzt:

16.8	g	Harnstoff
1.66	g	Acrylamid
0.09	g	N,N'-Methylenbisacrylamid
3.5	ml	0.9 M Tris, 0.9 M Borsäure, 25 mM EDTA
13	ml	Wasser

Dies resultiert in einer Endkonzentration von 5 % Polyacrylamid und 8 M Harnstoff im Gel. Die festen Bestandteile werden bei 37°C gelöst. Der Ansatz wird auf ein

Volumen von 35 ml gebracht und sterilfiltriert. Es werden 35 μ l TEMED und 210 μ l 10 % Ammoniumpersulfatlösung zugefügt und das Gel wird gegossen. Die Polymerisationszeit ist länger als eine Stunde.

Das Gel läuft eine halbe Stunde bei 46 W vor. Anschließend werden die vorher 5 Minuten gekochten Proben (erste Hälfte) aufgetragen. Die Elektrophorese wird fortgesetzt, bis der Farbstoff Xylencyanol 20 cm weit gelaufen ist; dann wird die zweite Hälfte der Proben aufgetragen. Ist der Farbstoff Bromphenolblau vom zweiten Probenauftrag am Gelende angekommen, wird die Elektrophorese beendet. Das Gel wird von der abstoßenden Gelplatte gelöst und 10 Minuten in 10 % Essigsäure, 5 % Methanol fixiert. Anschließend wird es 10 Minuten gewässert und 30 Minuten bei 80°C getrocknet. Signale werden autoradiographisch nachgewiesen; die Expositionszeit des Röntgenfilms ist in der Regel länger als 18 Stunden.

3.7.4. Sequenzierung G+C- reicher DNA

Bei Sequenzierung von DNA mit einem hohen Anteil der Nukleotide G und C kann es zu Problemen kommen. Zum einen neigt die einzelsträngige DNA zur Bildung von Sekundärstrukturen; dies kann dazu führen, daß die Klenow- Polymerase von der Einzelstrang-DNA "abspringt" und die Synthese des komplementären Strangs abbricht, obwohl an dieser Position kein Dideoxyanalogon eingebaut wurde. Im Sequenzgel führt dies zu durchlaufenden Banden, das

heißt zu Signalen in allen Spuren an einer Stelle der Sequenz.

Ein Ausweg kann die Verwendung alternativer Enzyme zur Sequenzierung sein. In diesem Zusammenhang werden eine modifizierte T7 DNA-Polymerase ("Sequenase", USB) und alternativ dazu die modifizierte DNA- Polymerase "Sequenzyme" (Anglian Biotechnology) verwendet und jeweils den Empfehlungen des Herstellers entsprechend verwendet.

Ein anderes Problem liegt in der Neigung des synthetisierten zweiten Strangs zur Bildung interner Sekundärstrukturen nach Trennung der beiden Stränge. Dies kann zu einem unregelmäßigen Abstand der Banden im Sequenzgel führen, der die Auswertung bisweilen erschwert.

Ein Ausweg ist hier die Ersetzung des dGTP in allen Sequenzierungsmixen durch 7-deaza-dGTP in derselben Konzentration (Mizusawa et al., 1986). Hierdurch wird die Bildung der Sekundärstrukturen innerhalb des neusynthetisierten Strangs verhindert.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierungsstrategie

Zunächst soll versucht werden, mRNA aus weißem Kaninchen-skelettmuskel in vitro zu translatieren und unter den in-vitro-Translationsprodukten Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten nachzuweisen. Dieses Experiment kann Aufschluß über die Abundanz der für diese Proteine kodierenden mRNA-Spezies und die Integrität der mRNA-Präparation liefern.

Anschließend werden Oligonukleotide entworfen, die komplementär zu Abschnitten der für Phosphorylase-Kinase kodierenden mRNA-Moleküle sind und somit als spezifische Hybridisierungsproben verwendet werden können. Mit diesen Proben soll versucht werden, die komplementären mRNA-Moleküle in Präparationen von mRNA aus Muskel nachzuweisen ("Northern-Blot"-Hybridisierung).

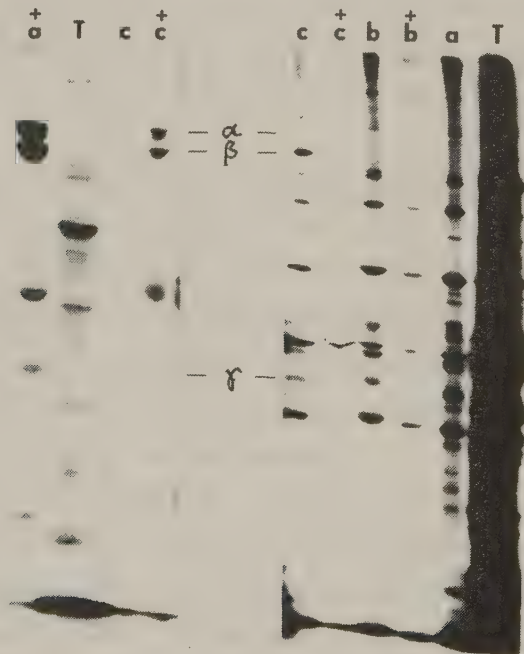
Die Größe der gesuchten mRNA-Moleküle und ihre Abundanz kann durch dieses Experiment ermittelt werden. Außerdem liefert es Hinweise über die Hybridisierungseigenschaften der Oligonukleotide, insbesondere über die Spezifität ihrer Bindung an die gesuchte mRNA. Wünschenswert ist die Markierung nur einer übereinstimmenden Bande durch verschiedene Oligonukleotidproben. Die Hybridisierungsbedingungen, unter denen eine solche spezifische Markierung erfolgt, sind hierbei empirisch zu ermitteln.

Die Hybridisierung einer aus Muskel-mRNA synthetisierten

cDNA- Bank mit solchen Oligonukleotidproben, die spezifisch mit den gesuchten Molekülen hybridisieren, sollte dann zur Klonierung von cDNA- Klonen führen, die für Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten kodieren.

4.2. Nachweis von Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten über in-vitro-Translation von mRNA

Die folgende Abbildung 3 zeigt das Ergebnis eines in-vitro-Translationsexperimentes ausgehend von mRNA aus weißem Kaninchenskelettmuskel mit anschließender Immunpräzipitation der Translationsprodukte.



Coomassie-Färbung

³⁵S-Fluorographie

- a : monoklonaler Antikörper anti- α 666/E2
- b : monoklonaler Antikörper anti α β γ 692/IA4
- c : Phosphorylase-Kinase-Antiserum
- + : Überschuß aufgereinigter Phosphorylase-Kinase vor Immunpräzipitation zugegeben
- T : totale in-vitro-Translationsprodukte

Nur mit dem Antiserum gegen Phosphorylase-Kinase gelang der Nachweis eines mit der reifen β -Untereinheit komigrierenden in-vitro-Translationsprodukts. Authentische Phosphorylase-Kinase kompetiert mit diesem Produkt um die entsprechenden Antikörper.

Ein mit der reifen α -Untereinheit komigrierendes Translationsprodukt ist in keinem Fall nachweisbar.

Dies kann bedeuten, daß die α -Phosphorylase-Kinase-mRNA im Gewebe deutlich weniger abundant als die β -mRNA ist. Denkbar ist aber auch, daß der Antikörper gegen die reife α -Untereinheit das primäre Translationsprodukt nicht erkennt, da es posttranslational modifiziert wird.

4.3. Entwurf von Oligonukleotiden als Hybridisierungsproben

Als spezifische Hybridisierungsproben für mRNA oder daraus synthetisierte cDNA können Oligonukleotide dienen, die komplementär zu bekannten Abschnitten der gesuchten mRNA-Sequenz sind.

Sind die Sequenzen von Peptiden des gesuchten Proteins bekannt, kann durch inverse Anwendung des genetischen Codes der entsprechende Abschnitt der mRNA abgeleitet werden, die für dieses Protein kodiert.

Durch die Degenerierung des genetischen Codes ergibt sich das Problem, daß einer bekannten Peptidsequenz nicht eine eindeutige mRNA-Sequenz entspricht, sondern eine Gruppe möglicher kodierender Sequenzen.

Beim Entwurf von zur mRNA- Sequenz komplementären Oligonukleotiden muß dies berücksichtigt werden. Drei verschiedene Wege bieten sich hierzu an:

1. Es werden alle möglichen Oligonukleotide in einem äquimolaren Gemisch synthetisiert, die zur gesuchten mRNA komplementär sein können. In der Praxis ergibt sich das Problem, daß unter Umständen ein nur sehr geringer Anteil des Oligonukleotidgemisches mit der gesuchten mRNA-Spezies hybridisiert. Außerdem sind die Hybridisierungsbedingungen möglicherweise nicht genau genug abzuschätzen .
2. An degenerierten Positionen des zu synthetisierenden Oligonukleotidgemisches wird die Base Inosin (Symbol I) eingebaut. Diese hybridisiert mit Adenin, Thymin, Uracil und Cytosin, jedoch nicht mit Guanin (Ohtsuka et al.,1985). Der höchstmögliche Degenerierungsgrad pro Position sinkt damit von vier auf zwei; eine Probengemisch gegebener Länge ist weniger komplex. Die Hybridisierungstemperatur kann außerdem mit geringerem Spielraum als im ersten Fall vorausgesagt werden.
3. Für den Fall, daß eine sehr lange Peptidsequenz zur Verfügung steht, kann bei jeder degenerierten Position die Base eingesetzt werden, die in den bisher sequenzierten mRNAs am häufigsten in den betreffenden Codons auftritt. Einzelne Fehlpaarungen haben bei sehr langen (>50 bp) Proben keinen großen Einfluß auf die Parameter der Hybridisierungsreaktion (s.u.)

Bei der Klonierung der beiden großen Untereinheiten von Phosphorylase- Kinase aus weißem Kaninchenmuskel wurden alle drei Wege eingeschlagen.

Die Proben A1, A2, A4, B1, B2 und B3 sind äquimolare Gemische von Oligonukleotiden mit 14 oder 20 Nukleotiden Länge.

Die Proben A3 und B4 (Länge 26 Nukleotide)enthalten Inosin an degenerierten Positionen.

Die Proben A5 und B5 (Länge 59 bzw. 56 Nukleotide) enthalten an degenerierten Positionen die empirisch wahrscheinlichste Komponente (Grantham et al., 1981).

Im folgenden werden die angesprochenen Oligonukleotide zusammen mit der Peptidsequenz, aus der sie abgeleitet wurden, und der mRNA- Sequenz, zu der sie jeweils komplementär sind, aufgelistet. Die Peptidsequenzdaten wurden von Dr. Helmut Meyer und Dr. John W. Crabb zur Verfügung gestellt.

N bedeutet eine vierfach degenerierte Position.

4.3.1. Oligonukleotide komplementär zu mRNA- Sequenzen der alpha- Untereinheit von Phosphorylase- Kinase

Probe A1

Peptid		Lys	Met	Glu	Asp	Gly	
mRNA	5'	AAA	AUG	CAA	GAC	GGN	3'
		G		G	U		
Probe	3'	TTT	TAC	GTT	CTG	CC	5'
		C		C	A		

Probe A2

Peptid mRNA	5'	Asp GAC U	Gly GGN	Tyr UAC U	Phe UUC U	Gly GGN	3'
Probe	3'	CTG A	CCN	ATG A	AAG A	CC	5'

Probe A3

Peptid		Ile	Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Glu	Ile	Lys	
mRNA	5'	AAU	AUG	CAA	CUN	AAA	UCN	CAA	AUA	AAA	3'
		C		G	U	G	AG	G	C	G	
		U							U		
Probe	3'	TAI	TAC	GTT	IAI	TTT	ICI	CTT	TAI	TT	5'
				C	C	C	GC	C			

Probe A4

Peptid mRNA	5'	Met AUG	Glu CAA G	Asp GAC U	Gly GGN	Tyr AUC U	Phe UUC	Gly GGN	3'
Probe	3'	TAC	GTT C	CTG A	CCN	ATG A	AAG A	CC	5'

Probe A5

Peptid mRNA	5'	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asn	Tyr	Asp	Glu	Leu-
		GAA	GAC	UAC	GAC	GAC	AAC	UAC	GAC	GAA	CUN-
		G	U	U	U	U	U	U	U	G	U
Probe	3'	CTC	CTG	ATG	CTG	CTG	TTG	ATG	CTG	CTG	GAC-
		Glu	Ser	Gly	Asp	Trp	Met	Asp	Gly	Tyr	Asn
		GAA	UCN	GGN	GAC	UGG	AUG	GAC	GGN	UAC	AAC 3'
		G	AG		U			U		U	U
		CTC	TCG	CCG	CTG	ACC	TAC	CTG	CCG	ATG	TT 5'

4.3.2. Oligonukleotide komplementär zu mRNA- Sequenzen der beta- Untereinheit von Phosphorylase Kinase

Probe B1

Peptid		Asn	Pro	Lys	Glu	Val	
mRNA	5'	AAC	CCN	AAA	CAA	GUN	3'
		U		G	G		
Probe	3'	TTG	GGN	TTT	GTT	CA	5'
		A		C	C		

Probe B2

Peptid		Lys	Glu	Tyr	Glu	Asp	
mRNA	5'	AAA	CAA	UAU	CAA	GAU	3'
		G	G	C	G	C	
Probe	3'	TTT	CTT	ATA	CTT	CT	5'
		C	C	G	C		

Probe B3

Peptid		Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Lys	Ile	Val	
mRNA	5'	GAU	UAU	UAU	UAU	AAA	AUA	GUN	3'
		C	C	C	C	G	U	C	
Probe	3'	CTA	ATA	ATA	ATA	TTT	TAA	CA	5'
		G	G	G	G	C	G	T	

Probe B4

Peptid		Pro	Asp	Asn	Glu	Thr	Leu	Trp	Asp	Lys	
mRNA	5'	CCN	GAC	AAC	GAA	ACN	CUN	UGG	GAC	AAA	3'
			U	U	G		U		U	G	
Probe	3'	GGC	CTI	TTI	CTT	TGC	IAC	ACC	CTI	TT	5'
		I			C	I	I				

Probe B5

Peptid		Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Pro	Ala	Asp	Phe	Val-
mRNA	5'	AAA	UAC	UAC	UAC	GUN	CCN	GCN	GAC	UUC	GUN-
		G	U	U	U				U	U	
Probe	3'	TTC	ATG	ATG	ATG	CAC	GGG	CGG	CTG	AAG	CAC-
		Glu	Tyr	Glu	Lys	Glu	Ile	Glu	Met	Thr	
		GAA	UAC	GAA	AAA	GAA	AUA	GAA	AUG	ACN	3'
		G	U	G	G	G	U	G			
							C				
		CTC	ATG	CTC	TTC	CTC	TAG	CTC	TAC	TG	5'

4.4. Hybridisierungsbedingungen für Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Ziel eines Hybridisierungsexperimentes ist die Duplexbildung zwischen einer, in der Regel radioaktiv, markierten DNA- Probe und einer Zielsequenz, die in immobilisierter DNA oder RNA bestehen kann.

Entscheidend für die Planung des Experiments ist die Stabilität des entstehenden Duplexmoleküls. Unter der Dissoziationstemperatur T_d versteht man diejenige Temperatur, bei der sich die Hälfte der Duplices einer bestimmten Spezies auflöst.

Für diese Temperatur gilt bei 0.9 M NaCl die Faustformel (Szostak et al., 1979):

$$(1) \quad T_d = 2^{\circ}\text{C} (\text{A}\cdot\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} (\text{G}\cdot\text{C}),$$

wenn (A·T) die Zahl der gebildeten AT- Basenpaare und (G·C) die Zahl der gebildeten GC- Basenpaare ist.

Für lange Duplices geben Young et al.(1983) als Formel für die Dissoziationstemperatur an:

(2)

$$T_d/^{\circ}\text{C} = 81.5 + 16.6 \log(c) + 0.41((\text{G}\cdot\text{C})/ n) - 0.72 c_{\text{FA}}$$

Hierbei sind:

- c die Konzentration monovalenter Kationen
- n die Zahl der insgesamt gebildeten Basenpaarungen
- c_{FA} die Konzentration an Formamid in %

Dies bedeutet, daß eine Verzehnfachung der Konzentration

monovalenter Kationen die Dissoziationstemperatur um 16.6°C erhöht, wohingegen ein zehnprozentiger Zusatz von Formamid zur Hybridisierungsflüssigkeit T_d um 7.2°C erniedrigt. Für jedes Prozent an Fehlpaarungen zwischen den Partnern im Duplexmolekül erniedrigt sich T_d zusätzlich um 1°C .

Das Hybridisierungsexperiment hat drei Teile:

Unspezifisch die Probe bindende Stellen des Filters werden in der Prähybridisierung mit einem Gemisch von Makromolekülen (Herings-DNA, Serumalbumin, Polyvinylpyrrolidon, Polysaccharid) abgesättigt.

Anschließend erfolgt die eigentliche Hybridisierung zwischen Probe und Zielsequenz durch Inkubation des Filters mit der immobilisierten DNA oder RNA zusammen mit der markierten Probe unter nicht stringenten Bedingungen, d.h. bei einer Temperatur weit unter der errechneten Dissoziationstemperatur der gewünschten Duplexspezies. In der Praxis hat sich die Verwendung eines Temperaturgradienten als sinnvoll erwiesen. Hierbei erfolgt die Inkubation zunächst bei einer Temperatur oberhalb von T_d und wird dann langsam bis unter T_d abgesenkt. Dies hat den Vorteil, daß sich im Laufe der Hybridisierung zunächst durch Bindung der spezifisch bindenden Oligonukleotidspezies die Duplex mit der höchsten Schmelztemperatur bildet. Eine Hybridisierung der Zielsequenz mit Probemolekülen, die unspezifischer an sie binden und so das spezifische Signal schwächen würden, wird auf diese Weise

vermieden.

In mehreren aufeinanderfolgenden Waschschritten steigender Stringenz werden die Duplices, die auf einer mehr oder weniger unspezifischen Bindung der Probe an Nukleinsäuresequenzen beruhen, aufgelöst. Übrig bleibt idealerweise die Duplexspezies zwischen Probe und gesuchter Zielsequenz, die autoradiographisch nachgewiesen werden kann.

Für ein Gelingen des Hybridisierungsexperiments kommt es auf eine optimale Wahl der Parameter Temperatur und Ionenkonzentration in allen drei Teilen des Experimentes an. Hierzu sollte die Dissoziationstemperatur des Duplexmoleküls zwischen gesuchter Zielsequenz und Probe bekannt sein. Dies stößt in der Praxis abhängig von der Natur der verwendeten Oligonukleotidprobe auf verschiedene Schwierigkeiten:

Verwendet man Oligonukleotidgemische als Probe (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4), so ist in den degenerierten Positionen unbekannt, ob sich ein AT- oder ein GC- Basenpaar bilden wird. Dies führt dazu, daß die Dissoziationsstemperatur nur als Temperaturbereich angebbar ist.

Ein Ausweg ist, der Waschflüssigkeit Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) in der Konzentration 3 M zuzufügen. Unter diesen Bedingungen vereinfacht sich die Faustformel (1) für T_d zu:

$$(3) \quad T_d = 3^{\circ}\text{C} \cdot n,$$

wenn n die Länge des Oligonukleotids ist (Wood et al.,

1985). Die Dissoziationstemperatur ist somit unter diesen Bedingungen unabhängig von der Basenzusammensetzung der Duplex.

Bei inosinhaltigen Proben kommt hinzu, daß Basenpaare, die Inosin als einen Partner enthalten, zur Dissoziationstemperatur nach der Faustformel (1) keinen Beitrag liefern, also die Zahl effektiv hybridisierender Basen kleiner ist als die Länge des Oligonukleotids.

Dies ist ebenfalls bei langen Proben der Fall, die an degenerierten Positionen nur das wahrscheinlichste Nukleotid enthalten. Die Unsicherheit über die Zahl effektiv hybridisierender Basen zwischen Probe und Zielsequenz stellt allerdings in der Praxis meist kein Problem dar, da auch bei einer begrenzten Zahl von Fehlpaarungen die dann zu wählenden experimentellen Bedingungen zur Auflösung aller unspezifischen Duplices ausreichen.

Die folgende Tabelle I listet die Oligonukleotidproben mit ihrer Länge n , der Zahl ihrer mit der Zielsequenz hybridisierenden Basen m , ihrem Degenerationsgrad x und ihrer theoretischen Dissoziationstemperatur T_d auf.

Tabelle II listet die in der Praxis verwendeten Hybridisierungsbedingungen für die Oligonukleotidproben auf.-

Tabelle I : Theoretische Dissoziations Temperaturen

Probe	Länge n	hybr. Basen m	Degene- ration x	$T_d / ^\circ C$	
				in 0.9 M NaCl	in 3 M TMAC
A1	14	14	8	38-44	42
A2	14	14	32	38-46	42
A3	26	20-22	64	48-62	60-66
A4	20	20	64	54-64	60
A5	59	39-59	1	> 98	> 117
B1	14	14	32	36-44	42
B2	14	14	16	34-42	42
B3	20	20	96	44-56	60
B4	26	19-22	16	54-68	57-66
B5	56	43-56	1	> 100	> 129

Tabelle II : Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Pro- be	Formamid- konzentration	Hybridisierungs- bedingungen		Waschbedingungen	
		Temperatur /°C		Puffer (sh.3.5.4.) Temperatur /°C	
A1	0	50 - 30		III	44
A2	0	50 - 30		III	44
A3	0	68 - 35		III	52
A4	0	70 - 38		I	50
A5	20 %	37		II	54
B1	0	55 - 25		III	43
B2	0	55 - 25		III	43
B3	0	65 - 36		III	54
B4	0	70 - 45		III	54
B5	20 %	37		II	54

Die Waschschrirte wurden jeweils zwei Mal 15 Minuten lang durchgeföhrt; angegeben ist die letzte, den stringentesten Bedingungen entsprechende Waschrtemperatur.

4.5. Nachweis von für Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten kodierenden mRNAs im "Northern Blot"

Alle Oligonukleotidproben, die ausgehend von Peptidsequenzdaten entworfen wurden, wurden zunächst zur Hybridisierung mit angereicherter mRNA im "Northern Blot" eingesetzt.

Dieses Experiment hat mehrere Ziele:

Zum einen dient es zur Bestimmung der für jedes Oligonukleotid optimalen Hybridisierungsbedingungen. Zweitens liefert es Aufschluß über die unspezifische Hybridisierung der verwendeten Probe mit ribosomaler RNA oder mit anderen mRNA-Molekülen. Zum dritten kann es Aufschluß über die Größe und die Abundanz der gesuchten mRNA-Moleküle liefern.

Da das Molekulargewicht der beiden Untereinheiten bekannt ist (138 kDa bzw. 125 kDa), kann über das mittlere Molekulargewicht einer Aminosäure die Länge der Proteine abgeschätzt werden. Sie beträgt etwa 1200 Aminosäuren für die α -Untereinheit und etwa 1100 Aminosäuren für die β -Untereinheit. Die gesuchten mRNA-Moleküle besitzen also eine Mindestlänge von 3600 bp(α) beziehungsweise 3300 bp(β). Informationen über die Abundanz der gesuchten mRNA-Moleküle, ihre Größe und die Spezifität ihrer Markierung durch verschiedene Proben sind für eine optimale Planung des "Screening"-Experimentes von entscheidender Bedeutung.

Die folgende Abbildung 4 zeigt zwei Beispiele für Hybridisierungen von "Northern Blots" mit synthetischen Oligonukleotidproben komplementär zu Abschnitten der mRNA für die α -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase. In den Spuren 1 und 3 sind jeweils 5 μg poly(A)⁺-RNA aufgetragen, in den Spuren 2 und 4 jeweils 20 μg poly(A)⁻-RNA (alle aus weißem Kaninchenskelettmuskel). Die Hybridisierung und das Abwaschen unspezifisch gebundener Aktivität erfolgte unter den im Abschnitt 4.4. angegebenen Bedingungen. Die Laufstrecken der 28S- und 18S- rRNA als Standard sind angegeben.

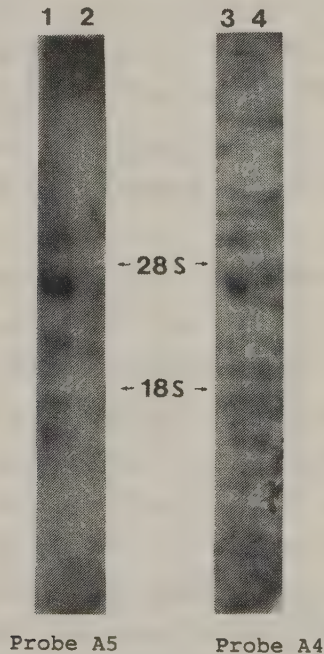


Abbildung 4: Hybridisierung von "Northern Blots" mit Oligonukleotiden komplementär zur mRNA der α -Untereinheit

Probe A4 markiert spezifisch eine Bande in der poly(A)^+ -Spur. Die markierte RNA-Spezies besitzt eine Länge von 4.3 kbp; sie wandert ein wenig schneller als die 28S-rRNA. Diese RNA ist groß genug, um den gesamten Leserahmen für ein Protein des Molekulargewichts 138 kDa zu beherbergen.

Die Probe A5 markiert fünf RNA-Spezies ausschließlich in der angereicherten poly(A)^+ -Fraktion. Die dem Haupt-signal entsprechende mRNA komigriert mit der spezifisch durch die Probe A4 markierten Molekül. Von den deutlich schwächere Nebensignale liefernden RNA-Spezies kommt aus Größengründen nur eine als mögliche mRNA für die α -Untereinheit in Frage.

Die Hauptmarkierungsprodukte zweier zur mRNA der α -Untereinheit komplementärer Oligonukleotide komigrieren also und besitzen eine Größe, die für die Kodierung eines Proteins des Molekulargewichts 138 kDa ausreichend ist.

Die Verwendung dieser Proben zur spezifischen Markierung von cDNA-Klonen der α -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase erscheint somit als aussichtsreiche Strategie zur Klonierung der gesuchten cDNA-Moleküle. -

Die Proben A1, A2 und A3 lieferten keine spezifische Markierung einer RNA-Spezies in der poly(A)^+ -Fraktion.

Auch mit keinem der Oligonukleotide, die komplementär zu Abschnitten der mRNA für die β -Untereinheit sind, konnte spezifisch eine RNA in der angereicherten poly(A)^+ -Fraktion markiert werden.

4.6. cDNA- Banken

4.6.1. Plasmid- cDNA- Bank aus weißem Kaninchenskelettmuskel

Diese cDNA-Bank wurde von Dr. M.W.Kilimann zur Verfügung gestellt. Eine Oligo(dT)-geprimte cDNA-Synthese ausgehend von poly(A)⁺-RNA aus Kaninchen- Psoasmuskel (gleiche Präparation wie im in vitro- Translationsexperiment und im "Northern Blot") erfolgte nach der Methode von Gubler und Hofmann (1983); die doppelsträngige cDNA wurde größenselektiert und die Fraktion mit Molekülen über 2.3 kBp Länge in die PstI- Erkennungsstelle des Plasmids pBR 322 kloniert. Mit den rekombinanten Plasmiden wurden die E. coli- Stämme C600, RR1 und DH5 transformiert. In jedem der drei Wirte wurde eine cDNA- Bank von etwa 3000 Kolo-nien erhalten.

4.6.2. Phagen- cDNA- Bank aus Kaninchenherz

Die Synthese dieser cDNA- Bank erfolgte wie unter Abschnitt 3.4. beschrieben.

Ausgangsmaterial waren 5 µg poly(A)⁺-RNA aus Kaninchenherz. Die Ausbeute an Erststrangprodukten war 1 µg, die Ausbeute an gesamter doppelsträngiger cDNA war 1.35 µg. Abbildung 5 zeigt die Größenverteilung der doppelsträngigen cDNA.

Die aus dieser Menge angelegte 1gt10- Bank enthielt

130000 Plaques rekombinanter Phagen.

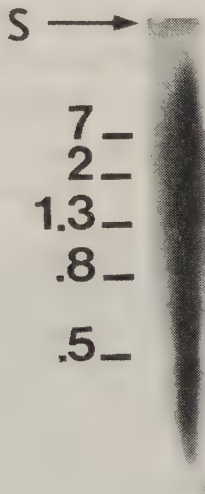


Abbildung 5 : Größenverteilung der doppelsträngigen
cDNA aus Kaninchenherz
linker Rand: Standardlaufstrecken in kBp

4.7. Klonierung der α -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase aus weißem Kaninchenskelettmuskel

Rekombinante Plasmid-DNA der Kolonien der unter 4.6.1. beschriebenen cDNA-Bank in pBR322 wurde mit den Oligonukleotidproben A4 und A5 hybridisiert. Es erfolgte eine parallele Hybridisierung zweier Replica einer jeden ursprünglichen Platte mit je einer Probe. Die Probenkonzentration war etwa $2 \cdot 10^6$ cpm/ml, die spezifische Aktivität

der Proben betrug ungefähr $2 \cdot 10^6$ cpm/pMol.

10 Kolonien von 9000 waren durch beide Proben markiert, je zwei in den Wirten RR1 und DH5 sowie sechs im Wirt C600 (siehe Abbildung 5). Der Anteil positiver Klone in der cDNA- Bank entspricht in etwa den Erwartungen ausgehend von der Abundanz des Proteins im Muskelgewebe (ungefähr 1% der löslichen Proteine).

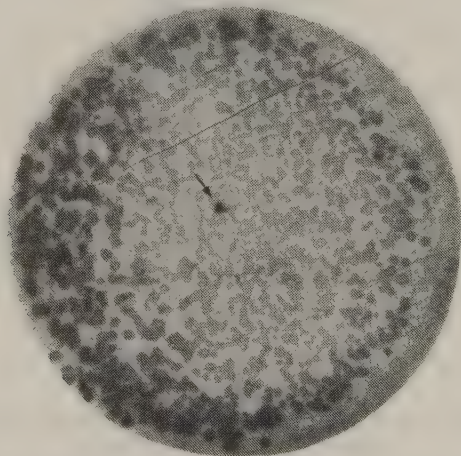


Abbildung 6: Koloniefilter (etwa 1000 Kolonien)
hybridisiert mit Probe A5

Zur Aufreinigung der Klone wurden markierte Kolonien oder Bereiche von den Ursprungsplatten abgenommen. Aliquots der entnommenen Zellen wurden erneut plattiert. Hierbei wurde eine Dichte von Kolonien angestrebt, die die Identifizierung einzelner Kolonien ermöglicht. Die Platten wurden repliziert und die Replica mit der Probe A5 hybridisiert.

Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis die von der Agarplatte entnommenen Zellen klonal waren.

Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde präpariert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Alle Klone wiesen ein gemeinsames Muster von EcoRI, PstI- und PvuII-Schnittstellen auf. Die DNA des längsten Klon in DH5, pPhk α 1, wurde sequenziert.

4.8. cDNA- Klone der β -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase aus weißem Kaninchen- skelettmuskel

Die Klone der β - Untereinheit wurden von Dr. M.W.Kilimann zur Verfügung gestellt. Die Klonierung gelang mit der Probe B3 aus einer ähnlich wie in 4.6.1. beschriebenen im Bakterienstamm DH5 angelegten cDNA- Bank.

Drei Klone von 5000 waren durch die Probe markiert; sie besaßen ein gemeinsames Muster von Restriktionsschnittstellen. Der längste Klon, p β Phk-D1N, wurde sequenziert.

4.9. Sequenzdaten der cDNA- Klone der α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase aus weißem Kaninchenskelettmuskel

4.9.1. Sequenz der cDNA p α Phk-D1 und vollständige Primärsequenz der α - Untereinheit

Das Insert des Klons p α Phk-D1 wurde mit den Restriktionsenzymen PstI, PvuII, HindIII, AluI, HaeIII und Sau3A fragmentiert. Die Fragmente wurden isoliert, in die entsprechende Erkennungsstelle eines der M13-Stämme mp8 und mp19 kloniert und sequenziert.

Hierbei wurde jede Teilsequenz mindestens zweimal und in aller Regel in beiden Richtungen bestimmt; jede Restriktionsschnittstelle wurde mindestens durch eine Sequenzab-lesung überbrückt. Die folgende Abbildung 7 zeigt die Sequenzierungsstrategie .

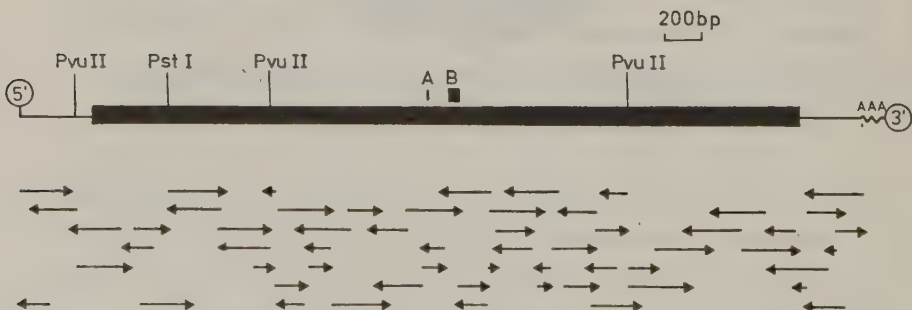


Abbildung 7 : Sequenzierungsstrategie des Klons p α Phk-D1. Die Pfeile zeigen Länge und Richtung der Sequenzgelablesungen. Der ausgefüllte Balken gibt den kodierenden Bereich wieder; die mit den Oligonukleotiden A4 und A5 hybridisierenden Partialsequenzen sind durch A und B markiert.

Abbildung 8 auf der folgenden Seite gibt die Gesamtsequenz des Klons p α Phk-D1 wieder. Er besteht aus einer Teilsequenz von 388 5'-flankierenden Nukleotiden, einem großen offenen Leserahmen von 3711 Nukleotiden, einer 3'-flankierenden Sequenz von 342 Nukleotiden und einem poly(A)-Schwanz von 10 Nukleotiden.

Die 5'-flankierende Sequenz ist G+C- reich (66.7%) und enthält eine inverse Wiederholung von 11 Nukleotiden Länge (Beginn bei den Nukleotiden -187 und -130). Der Beginn des großen offenen Leserahmens kodiert für die N-terminale Aminosäuresequenz, die bei einem Edman- Abbau der gesamten α -Untereinheit erhalten wurde (Crabb and Heilmeyer, 1984). Die Nukleotidsequenz in der Umgebung des Translationsbeginns, CGGCAATGA, zeigt nur mäßige Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz für den Translationsbeginn, CC(G,A)CCAUGG (Kozak, 1984). Zwei Stop-Codons gehen dem offenen Leserahmen voraus (Beginn bei den Nukleotiden -15 und -24).

Bei den meisten sequenzierten eukaryotischen mRNA- Molekülen beginnt die Translation bei dem ersten AUG- Codon (Kozak, 1984). Im Unterschied dazu geht dem langen offenen Leserahmen im Klon p α Phk-D1 ein kurzer Leserahmen (Nukleotide -317 bis -285) voraus. Die Nukleotidsequenz, die das AUG- Codon dieses ersten Leserahmens umgibt, hat keine Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz für den Translationsbeginn.

Die 3'-nichtkodierende Region des Klons enthält ein un-

Abbildung 8 :

Gesamte cDNA- Sequenz des Klons $\rho\alpha$ Phk-D1 und abgeleitete Aminosäuresequenz.

Nukleotide sind vom 5' zum 3'- Ende des Klons nummeriert; die Numerierung ist positiv vom Beginn des Leserahmes an; im 5'-nichttranslatierten Teil des Klons ist die Numerierung negativ.

Die Nukleotide, die zu den Oligonukleotidproben A4 und A5 komplementär sind, sind überstrichen.

In den nichttranslatierten Bereichen des Klons sind Stop-Codons im Leserahmen und inverse Sequenzwiederholungen unterstrichen. Im 5'-nichtkodierenden Bereich ist der kurze Leserahmen überstrichen. Die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ist unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Die durch Peptidsequenzierung bestätigten Partialsequenzen sind unterstrichen (Daten von Dr.H.E. Meyer, Institut für Physiologische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum und Dr. J.W.Crabb, W.Alton Jones Cell Science Center, Lake Placid, New York, USA). Die FITC- Bindungsstelle (Lysin 588, Zaman et al., im Druck) ist durch einen Stern markiert. Endogen phosphorylierte Serine sind durch ein eingekreistes P und durch Autophosphorylierung phosphorylierte Serine durch ein eingerahmtes P unterhalb der jeweiligen Position markiert (Meyer et al., Manuskript zur Publikation eringereicht). Serin 1018 ist die Phosphorylierungsstelle der cAMP- abhängigen Proteinkinase (Cohen et al., 1975)

-271
 -136
 -135
 45
 270
 405
 130
 540
 180
 225
 810
 270
 315
 945
 1080
 1260
 405
 1350
 1485
 1620
 540
 1755
 585
 1890
 630
 2025
 2160
 2295
 765
 2430
 2810
 2565
 855
 2700
 2835
 945
 2970
 3190
 1035
 1240
 3080
 3375
 3510
 3645
 1215
 3780
 3915
 4050

vollständiges Polyadenylierungssignal (AATAATAA), das 25 Nukleotide in 5'-Richtung von der Polyadenylierungsstelle entfernt liegt. Ein weiteres unvollständiges Polyadenylierungssignal (ATAAAA) befindet sich 78 Nukleotide weiter in 5'-Richtung.

Die Nukleotidsequenz des Leserahmens kodiert für ein Protein mit 1237 Aminosäuren und dem Molekulargewicht 138 422 Da. Etwa die Hälfte dieser Aminosäuresequenz, darunter das Aminoende und das Carboxylende des Proteins, sind durch Peptidsequenzierung bestätigt worden. Eine einzige Differenz zwischen Peptid- und cDNA- Sequenzdaten ergab sich ursprünglich an Position 1026. Das Codon AAT in der cDNA kodiert für Asparagin, wohingegen im entsprechenden Peptid an dieser Position eine Asparaginsäure gefunden worden war. Partielle Sequenzierung eines zweiten unabhängigen cDNA- Klons (α Phk-R1) in diesem Sequenzbereich liefert jedoch an Position 1026 das für Asparaginsäure kodierende Codon GAT. Ursache für diesen Unterschied könnte ein allelischer Polymorphismus in der α - Untereinheit oder auch ein Klonierungsartefakt sein. Innerhalb der Peptidsequenz konnten Phosphoserine eindeutig mit Hilfe einer Methode lokalisiert werden, in deren Verlauf Phosphoserin zu S-Ethylcystein modifiziert wird (Meyer et al., 1988). Innerhalb der sequenzierten Peptide befinden sich drei Serine, die autophosphoryliert werden können und vier endogen phosphorylierte Serine, von denen eines mit der Phosphorylierungsstelle durch die cAMP-

abhängige Proteinkinase (Cohen et al., 1975) identisch ist.

Die durch die cDNA-Sequenz vorausgesagte Aminosäurezusammensetzung des Proteins stimmt gut mit der experimentell ermittelten Aminosäurezusammensetzung der α -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase überein (s.u.).

	<u>aus cDNA</u>		<u>Protein-Analyse</u>		<u>aus cDNA</u>		<u>Protein-Analyse</u>
	total	%	%		total	%	%
Ala	82	6.6	6.5	Ile	69	5.5	5.2
Arg	62	5.0	5.2	Leu	142	11.4	11.5
Asp	66	5.2		Lys	63	5.0	5.0
Asn	34	2.8		Met	36	2.9	3.0
Asx		8.0	8.0	Phe	38	3.0	3.0
Cys	19	1.5	1.7	Pro	60	4.8	5.0
Gln	60	4.8		Ser	99	7.9	7.7
Glu	85	6.8		Thr	71	5.7	5.6
Glx		11.6	12.0	Trp	13	1.0	1.4
Gly	79	6.3	6.5	Tyr	45	3.6	3.7
His	35	2.8	2.7	Val	79	6.3	6.3

Tabelle 3 : Aminosäurezusammensetzung der α -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase

Die cDNA des Klon $p\alpha$ Phk-D1 markiert im "Northern Blot" spezifisch eine mRNA der Größe 4.4 kBp, die mit der von den Oligonukleotidproben A4 und A5 (vgl. 4.5.) markierten mRNA komigriert (Daten von M.W. Kilimann und B. Harmann; Zander et al., 1988). Die klonierte cDNA ist also eine beinahe vollständige Kopie der mRNA.

4.9.2. Sequenz der cDNA pBPhk-D1N und vollständige Primärsequenz der β - Untereinheit

Die cDNA des Inserts von Klon pBPhk-D1N wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI, PstI, PvuII, AluI, HaeIII und Sau3A fragmentiert. Fragmente wurden isoliert, in die entsprechenden Erkennungsstellen eines der M13-Stämme mp8 und mp19 kloniert und sequenziert. Die folgende Abbildung 9 zeigt die Sequenzierungsstrategie.

Jede Partialsequenz wurde mindestens zweimal und in der Regel in beiden Richtungen sequenziert, jede Restriktionsschnittstelle wurde durch mindestens eine Sequenzgelablesung überbrückt.

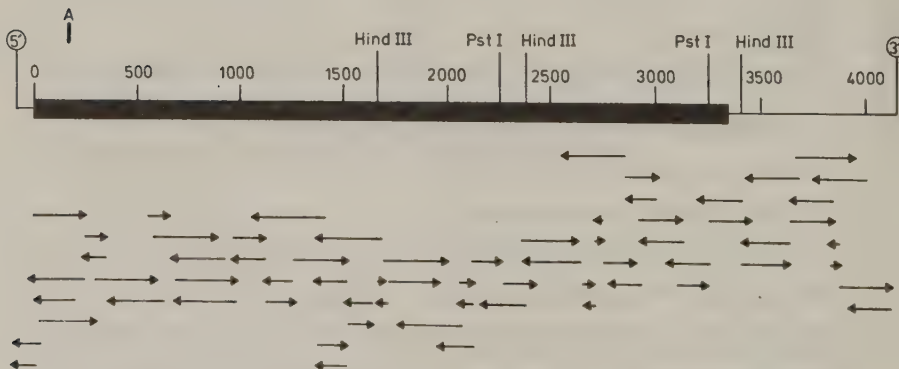


Abbildung 9 :

Sequenzierungsstrategie des Klon pBPhk-D1N. Pfeile zeigen Länge und Richtung der Sequenzgelablesungen. Die kodierende Sequenz ist durch den ausgefüllten Balken markiert, die mit der Probe B3 hybridisierende Partialsequenz ist oberhalb des Balkens durch A markiert.

Die Abbildung 10 auf der folgenden Seite zeigt die Gesamtsequenz des Klons pßPhk-D1N .

Die 5'-nichttranslatierte Partialsequenz besteht aus 41 Nukleotiden G, 14 Nukleotiden C und 2 Nukleotiden A, ist also extrem G+C- reich.

Die 3'- flankierende Sequenz besteht aus 764 Nukleotiden und ist A+T- reich (63 %). Sie enthält eine Reihe von Stop-Codons im Leserahmen und einige inverse Sequenzwiederholungen. Am 3'-Ende des Klons befindet sich kein poly(A)- Abschnitt. Eine Polyadenylierungssignalsequenz (ATTAAA) befindet sich jedoch 22 Nukleotide vom 3'-Ende des Klons entfernt, so daß vermutet werden kann, daß der am 3'- Ende fehlende Abschnitt des Klons nur wenige Nukleotide lang ist.

Ein langer offener Leserahmen beginnt mit dem ersten ATG-Codon und umfaßt 3279 Nukleotide. Die Sequenz in der Umgebung des Anfangscodons ,GCGCGAUGG, hat eine gewisse Ähnlichkeit zur Konsensussequenz für den Translationsbeginn , CC(G,A)CCAUGG (Kozak, 1984).

Der Aminoterminus der reifen β -Untereinheit ist blockiert (Crabb and Heilmeyer, 1984). Das N-terminale Lys-C- Fragment der β -Untereinheit hat die die Sequenz Ac-A-G-A-T-G-L-M-A-E-V-S-W-K (bestimmt durch "Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy", Einzelheiten in: Meyer et al., Manuskript zur Publikation eingereicht). In der reifen β -Untereinheit ist also das Initiations- Methionin durch eine Acetylgruppe ersetzt worden.

Abbildung 10:

Nukleotidsequenz des Klons pBPhk-D1N und abgeleitete Aminosäuresequenz der β -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase.

Die Nukleotidnumerierung beginnt mit dem ersten Nukleotid des ersten Methionincodons und läuft in 3'-Richtung mit positiven Werten weiter; im 5'-nichttranslatierten Bereich ist die Numerierung negativ.

Die Erkennungsstelle der Oligonukleotidprobe und Stop-Codons im 3'-nichttranslatierten Bereich sind unterstrichen.

Die Aminosäurennumerierung beginnt mit dem auf das erste Methionin folgenden Alanin, das die erste Aminosäure in der reifen β -Untereinheit darstellt. Der Stern markiert die Acetylgruppe, die im reifen Protein den N-terminus blockiert. Unterstrichene Aminosäurepartialsequenzen sind durch Peptidsequenzierung bestätigt (Daten von Dr. H.E.Meyer und Carl C. Kuhn, Institut für Physiologische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum und von Dr. W.C.Crabb, W.Alton Jones Cell Science Center, Lake Placid, USA).

Drei autophosphorylierbare Serinreste sind durch ein eingerahmtes P unterhalb der Aminosäuresequenz gekennzeichnet, endogen phosphorylierte Serine durch ein eingekreistes P (Meyer et al., Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht).

TCCTATTAATCTTGGGACATGCTGGCGCTGGCGTCTGACCTGCTGGGAGATCACTGACCTGCTGATCGATCGGCAATCCAAATCGGTGAAGAAGCTGTTTAACTCAAGTGT	3480
GAAAGATCTTCATCATCTATCAACCACTCAAAAGAAATCTCTCAACCAATCAAGAAATAGTTCACTGCAATGAAAAATCACTGCTGCATGTTTATGATGACATCTACAGAAATCAATC	3490
AGCTGCTCTGCGGCTGATCTTCATCTCTCTGCGCATCTAAATAGTATTTGGCAATAGTATGCTCATCTGAAATCAAAAGCAATCTGAAGAATGTGGGAACATTTTATGATGGCAATTCG	3720
AGCTGATGAAAAGAGCTGTTCATCTACAGCAATAAAGCAAAATCAATCAATCTCTGAGAGCAAGTATATTAATATTTTGTGTATCAGAGCATTTGATCAATCTCTGTA	3840
CTCATCTAGCTGTTTGTGATCTGTGCTTAATATAGGCTTAGCATCATATGCTAAATCTATGATGCTACCAACATCTTCTGTGAGCTCTACGATAAAGTAAATGAATGAGATGTTC	3960
GGAGCTGCTTAAATCTCAGGACATCTACCTGTGTGCTGATGTAATAAAATTTTCTTAAATCAATTAATCTCTCTGCTGGG	4044

Etwa 40 % der gesamten abgeleiteten Aminosäuresequenz der β -Untereinheit konnte durch Peptidsequenzierung bestätigt werden. An Position 27 wird aus der cDNA-Sequenz ein Valin in der Aminosäuresequenz abgeleitet; Peptidsequenzierung unabhängig isolierter Peptide liefert an dieser Position entweder ein Valin oder ein Isoleucin (Meyer et al., Manuskript eingereicht). Dieser Polymorphismus der β -Untereinheit wurde bereits von Cohen et al. (1975) beschrieben.

Drei Serine, die durch Autophosphorylierung phosphoryliert werden können, konnten per Peptidsequenzierung gefunden werden (Meyer et al., Manuskript eingereicht); ein Serinrest (Serin 26) ist identisch mit der Phosphorylierungsstelle der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Cohen et al., 1975). Serin 700 ist sowohl endogen phosphoryliert als auch autophosphorylierbar; eine weitere endogen phosphorylierte Serinposition befindet sich 4 Positionen stromauf des C-terminalen Serins.

Die aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz der β -Untereinheit abgeleitete Zusammensetzung des Proteins stimmt gut mit der experimentell ermittelten Zusammensetzung überein (Crabb und Heilmeyer, 1984):

	aus cDNA		Protein- Analyse			aus cDNA		Protein- Analyse	
	total	%		%		total	%		%
Ala	48	4.3	4.8		Ile	70	6.4	5.6	
Arg	61	5.5	5.9		Leu	127	11.6	11.5	
Asp	60	5.4			Lys	68	6.2	6.9	
Asn	47	4.3			Met	21	1.9	2.0	
Asx		9.7	9.7		Phe	42	3.8	3.6	
Cys	19	1.7	2.0		Pro	56	5.1	5.1	
Gln	60	5.4			Ser	69	6.3	6.5	
Glu	71	6.5			Thr	49	4.4	4.5	
Glx		11.9	12.2		Trp	14	1.2	1.2	
Gly	65	5.9	6.5		Tyr	49	4.4	3.4	
His	25	2.2	2.3		Val	71	6.5	6.4	

Tabelle 4 : Aminosäurezusammensetzung der
 β -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase

Die von der cDNA des Klons pBPhk-D1N im "Northern Blot" markierte Hauptbande besitzt eine Größe von 4.2 kBp (Daten von B.Harmann und M.W. Kilimann; Kilimann et al., 1988). Die cDNA ist somit eine nahezu vollständige Kopie der zugehörigen mRNA .

4.10. Homologie zwischen α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase

Ein Sequenzvergleich zwischen der α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase zeigt, daß die beiden Polypeptide homolog sind.

Abbildung 11 stellt die beiden Sequenzen einander gegenüber, in Abbildung 12 ist die Ähnlichkeit beider Moleküle schematisch dargestellt.

Es wechseln sich Sequenzbereiche, die zwischen beiden Untereinheiten mehr oder weniger ähnlich sind, mit anderen Sequenzbereichen ab, die für je ein Molekül spezi-

Abbildung 11:

Sequenzgegenüberstellung der α - und β -Untereinheit von Phosphorylase- Kinase. Identische Aminosäuren sind durch einen Doppelpunkt, konservativ ausgetauschte Reste durch einen einfachen Punkt und Lücken durch einen Bindestrich gekennzeichnet. Autophosphorylierbare Serine sind durch ein eingeschachteltes P, endogenes Phosphat tragende Serine durch ein eingekreistes P und die durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphorylierbare Serine durch ein Dreieck kenntlich gemacht. Geladene Aminosäuren in der Umgebung dieser Serine, denen eine Bedeutung bei der Substraterkennung durch eine Proteinkinase zukommen könnte, sind unterstrichen. Mögliche Calmodulin- Bindungsstellen sind unter- oder überstrichen. Lysin 588 in der α -Untereinheit ist spezifisch durch FITC markierbar.

Abbildung 12:

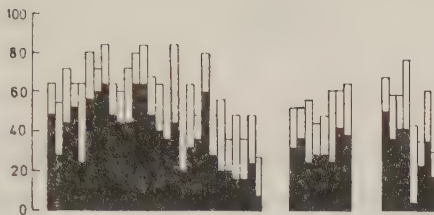
Schematische Darstellung der Homologie der α - und β -Untereinheit von Phosphorylase- Kinase und Vorhersage von Strukturparametern beider Untereinheiten.

Das Balkendiagramm gibt den Anteil identischer (ausgefüllte Balken) und zusätzlich konservativ ausgetauschter (offene Balken) Aminosäuren an. Jeder Balken steht für einen Sequenzbereich von 25 Aminosäuren. Ausnahmen hiervon sind der letzte Balken in der Domäne B (15 Aminosäuren) und die Balken in der Domäne F (23 Aminosäuren).

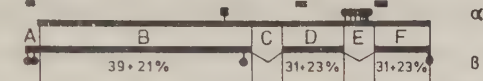
Darunter sind die homologen und nichthomologen Domänen beider Untereinheiten schematisch gegenübergestellt. Phosphorylierungsstellen sind durch ausgefüllte Kreise, mögliche Calmodulinbindungsstellen durch Balken und die FITC- Bindungsstelle in der α -Untereinheit durch ein ausgefülltes Quadrat angedeutet. Unterhalb der beiden Sequenzbalken ist der Anteil identischer Aminosäurereste (erste Zahl) und zusätzlich konservativ ausgetauschter Aminosäuren (zweite Zahl) jeweils gemittelt über einen ganzen Sequenzabschnitt angegeben.

Die Diagramme im unteren Bereich zeigen das Hydropathieprofil (Kyte and Doolittle, 1982), das β - Faltblattprofil und das α -Helixpotential (Chou and Fasman, 1978) beider Untereinheiten im Vergleich. Parameter wurden jeweils für einen Unterbereich von 20 Resten ("Fenstergröße") berechnet.

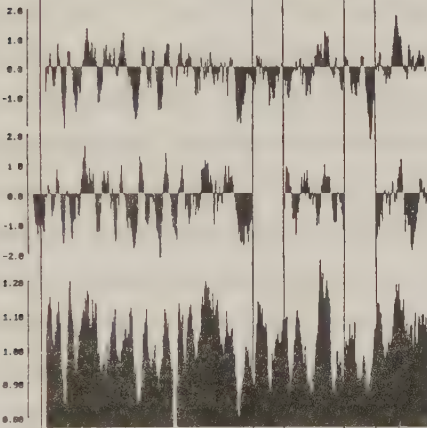
SEQUENZÜBEREINSTIMMUNG (%)



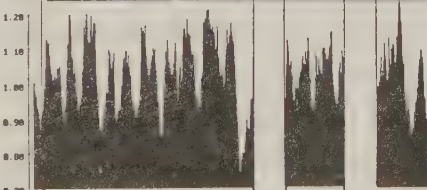
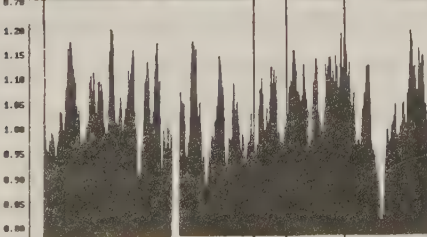
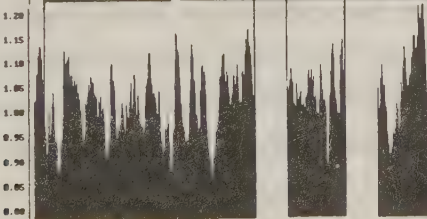
HYDROPATHIE

 α β α

BETA-FALTBLATTPOTENTIAL

 β α

ALPHA-HELIXPOTENTIAL

 β α  β 

fisch sind. Bei den Domänen, die nur in je einem Molekül auftreten, handelt es sich um den Aminoterminus der β -Untereinheit (Domäne A in Abbildung 12) und zwei Abschnitte in der Mitte der α -Untereinheit (Domänen C und E in dieser Abbildung).

Der Ähnlichkeitsgrad der beiden Moleküle in den Sequenzabschnitten B, D und F ist recht unterschiedlich. In der Domäne B sind 39% der Aminosäurereste in beiden Untereinheiten identisch und weitere 21% konservativ ausgetauscht (Kriterien nach Dayhoff, 1978). Als Folge dieser großen Sequenzähnlichkeit ist das Hydropathieprofil (Kyte and Doolittle, 1982), das β -Faltblattpotential und das α -Helixpotential (Chou and Fasman, 1978) beider Untereinheiten in diesem Abschnitt ebenfalls sehr ähnlich, selbst zum Ende der Domäne B hin, an dem die Sequenzähnlichkeit beider Untereinheiten deutlich abnimmt.

Der Sequenzabschnitt D zeigt eine über seine ganze Länge recht einheitliche Sequenzähnlichkeit (31% der Aminosäuren identisch, weitere 23% konservativ ausgetauscht). Die Konservierung des Hydropathieprofils und der Potentiale für die Bildung von α -Helix- oder β -Faltblattstrukturen ist hier jedoch nicht sehr ausgeprägt.

Die Domäne F zeigt einen Aufbau aus zwei konservierten Sequenzabschnitten, die durch einen nichtkonservierten Bereich verbunden sind. Die fast identische Länge beider Moleküle in dieser Region und die Konservierung des α -Helixpotentials sprechen jedoch für eine Homologie beider Moleküle auch in diesem Bereich.

Es ist auffällig, daß von den elf Phosphorylierungsstellen, die insgesamt in beiden Untereinheiten bisher lokalisiert worden sind, sich neun in Domänen befinden, die für je eine Untereinheit spezifisch sind und keine Entsprechung in der je anderen Untereinheit besitzen. Eine Ausnahme von dieser Regel sind nur die Serine 700 und 1088 in der β -Untereinheit. Serin 700 befindet sich in der homologen Domäne B, allerdings nahe an deren Ende in einem Unterbereich, in dem die Ähnlichkeit zwischen beiden Sequenzen bereits deutlich abnimmt. Serin 1088 ist vier Positionen stromauf des C-terminalen Serins der β -Untereinheit lokalisiert. Eine ausführliche Diskussion der Lokalisation der Phosphoserine in spezifischen Domänen im Hinblick auf die Bedeutung dieser Beobachtung für die Evolution von Phosphorylase- Kinase erfolgt im Diskussteil dieser Arbeit.

Calmodulin- Bindungsstellen einer Reihe von Proteinen sind in ihrer Sequenz bekannt. Es handelt sich um Sequenzabschnitte, die reich an basischen, hydrophoben und aromatischen Aminosäuren sind und die in der Sekundärstruktur einer basischen amphipathischen α - Helix vorliegen. In der Mitte einer solchen Sequenz liegt häufig ein Tryptophanrest vor, die C-terminale Hälfte ist manchmal reich an Serinresten (Buschmeier et al., 1987).

Die α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase können an der Interaktion mit endogenem (Untereinheit δ) oder exogenem (Untereinheit δ') Calmodulin beteiligt sein.

Eine Anzahl von Partialsequenzen erfüllt die strukturellen Voraussetzungen für eine Calmodulin- Bindungsstelle. Im aminoterminalen Abschnitt der β - Untereinheit (Aminosäuren 6 bis 28) finden sich zum Beispiel sechs basische, fünf hydrophobe und zwei aromatische Aminosäuren, darunter ein zentrales Tryptophan (Aminosäure 12).

Zwei weitere mögliche Calmodulin- Bindungsstellen liegen in homologen Bereichen der beiden Untereinheiten. Die erste (α 813-839; β 767-794) befindet sich in Domäne D, die zweite Bindungsstelle am Anfang der Domäne F (α 1064-10950; β 919-951). In beiden Partialsequenzen ist ein regelmäßiges Muster von aromatischen und basischen Aminosäuren erhalten. In der C-terminalen Hälfte des ersten Sequenzabschnitts der β - Untereinheit treten drei Serinreste auf.

Die Sequenzen der zweiten möglichen Calmodulin- Bindungsstelle in beiden Proteinen sind sehr ähnlich (15 Aminosäuren identisch, 9 Aminosäuren konservativ ausgetauscht, 8 Aminosäuren nichtkonservativ ausgetauscht). Die mögliche funktionelle Bedeutung dieser Calmodulin-Bindungsstellen wird im Diskussionsteil dieser Arbeit ausführlich besprochen.

4.11. Homologie der Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten zu anderen Proteinen

Sequenzähnlichkeiten zwischen den beiden sequenzierten Untereinheiten von Phosphorylase- Kinase und anderen sequenzierten Proteinen konnten in den zur Verfügung stehenden Datenbanken (EMBL/GenBank Genetic Sequence Database GenBank (IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA), Release 56.0 (1988); EMBL/GenBank Genetic Sequence Database- EMBL Nucleotide Sequence Data Library (Eur.Mol.Biol.Lab., Heidelberg), Release 16.0 (1988) und Protein Identification Resource - Protein Sequence Database (Natl.Biomed.Res.Found, Washington, DC, USA) , Release 17.0 (1988)) nicht gefunden werden. Insbesondere zeigten die sequenzierten Polypeptide keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten mit katalytischen oder regulatorischen Untereinheiten oder Domänen anderer Proteinkinasen (cAMP- und cGMP- abhängige Proteinkinase, Myosin Light Chain- Kinase, Proteinkinase C und calmodulinabhängige Proteinkinase II aus Hirn).

4.12. Klonierung von cDNA-Klonen der α - und β - Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase aus Kaninchenherz

Replica mit rekombinanter cDNA aus der unter 4.6.2. beschriebenen Phagen-cDNA-Bank aus Kaninchenherz wurden mit Fragmenten der cDNAs $p\alpha$ Phk-D1 und $p\beta$ Phk-D1N hybridisiert. Als Proben wurden Sequenzen von den 5'-Enden der cDNAs gewählt, um auf Phagenklone mit möglichst langem Insert zu selektieren. Die cDNA wurde wie unter 3.5.5.1. beschrieben markiert. Die spezifische Aktivität der Probe betrug etwa $0.2 \cdot 10^6$ cpm/ng doppelsträngige DNA, die Probenkonzentration in der Hybridisierung betrug etwa 10^6 cpm/ml. Die Hybridisierungsbedingungen sind unter 3.5.6. beschrieben.

Die α -Probe reichte vom 5'-Ende der cDNA $p\alpha$ Phk-D1 bis zum Nukleotid 402, die β -Probe vom Nukleotid 26 bis zum Nukleotid 228 (vgl. Abbildungen 8 und 10).

Zwei Phagenklone konnten durch die α -Probe, sieben Klone durch die β -Probe markiert werden.

Markierte Plaques bzw. Bereiche wurden aus den Originalplatten ausgestochen und Aliquots der entnommenen Phagen erneut plattiert. Die erhaltenen Platten wurden repliziert und die Replica erneut mit der jeweiligen Probe hybridisiert. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis die entnommenen Phagen klonal waren.

Nach dieser Aufreinigung stellte sich heraus, daß die beiden α -Klone und sechs der β -Klone ein jeweils identi-

sches Muster an EcoRI- Erkennungsstellen besitzen. Je ein Klon einer jeden Untereinheit (1α HPhk1 und 1β HPhk1) wurde zur Sequenzierung ausgewählt.

Abbildung 13 zeigt ein mit der β -Probe hybridisiertes Replicon aus der cDNA- Bank in λ gt10.

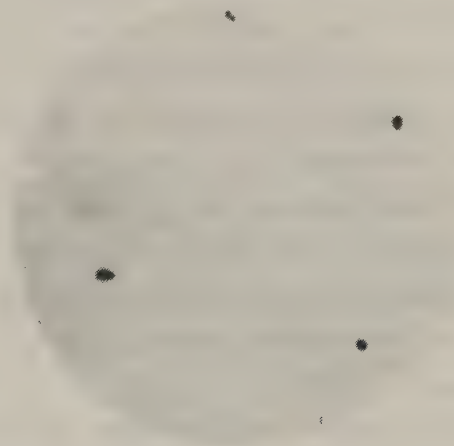


Abbildung 13:

Replicon aus der λ gt10- cDNA-Bank aus Kaninchenherz (etwa 25000 rekombinante Plaques), hybridisiert mit der β -Phosphorylase-Kinase- Probe aus weißem Kaninchenskelettmuskel (Hybridisierungsbedingungen siehe 3.5.6.).

4.13. Sequenzdaten der cDNA- Moleküle der α -
und β - Untereinheit von Phosphorylase-
Kinase aus Kaninchenherz

4.13.1. Sequenz der cDNA $\lambda\alpha$ HPhk1

Das Insert des Klons $\lambda\alpha$ HPhk1 wurde mit EcoRI aus dem Vektor herausgeschnitten und mit HindIII, PvuII, AluI, HaeIII und Sau3A fragmentiert. Fragmente wurden in die entsprechenden Erkennungsstellen der M13-Stämme mp8 und mp19 kloniert und sequenziert.

Abbildung 14 zeigt die Sequenzierungsstrategie dieser cDNA.

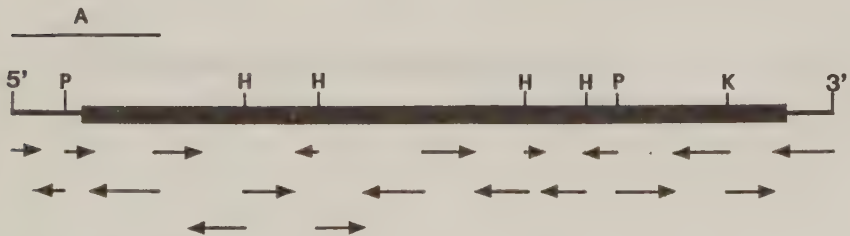


Abbildung 14:

Sequenzierungsstrategie der cDNA $\lambda\alpha$ HPhk1. Die Pfeile zeigen Richtung und Länge der Sequenzgelablesungen. Die kodierende Sequenz ist als breiter Balken dargestellt. Die zur Probe aus $\rho\alpha$ Phk-D1 komplementäre Sequenz ist durch ein A markiert. Großbuchstaben stehen für Restriktionsschnittstellen: P=PvuII, H=HindIII, K=KpnI.

Die Sequenz entspricht exakt der Sequenz der cDNA $\rho\alpha$ Phk-D1 vom Nukleotid -365 an bis zur einzigen EcoRI-Erkennungsstelle der cDNA (Nukleotid 3944). Ein kleines, 3'-terminales EcoRI-Fragment wie im Klon $\rho\alpha$ Phk-D1 konnte nicht gefunden werden.

Zur Kontrolle wurden auch die beiden terminalen Partialsequenzen des Klons 1 α HPhk2 bestimmt. Sie stimmen auf eine Länge von mehr als 100 Nukleotiden mit der jeweils entsprechenden Sequenz des Klons 1 α HPhk1 überein. Insbesondere sind auch die 5'-Enden beider cDNAs identisch.

4.13.2. Sequenz der cDNA 1BHPk1

Das Insert des Klon 1BHPk1 wurde mit EcoRI aus dem Vektor geschnitten und dabei fragmentiert. Die EcoRI-Fragmente wurden weiter mit HindIII, AluI, Sau3A und PvuII fragmentiert, die Fragmente wurden in entsprechende Erkennungsstellen der M13-Stämme mp8 und mp19 kloniert und sequenziert.

Abbildung 15 zeigt die Sequenzierungsstrategie dieser cDNA. Sequenzabschnitte, die sich von der Sequenz der β -cDNA aus weißem Skelettmuskel unterscheiden, wurden in beiden Richtungen sequenziert.

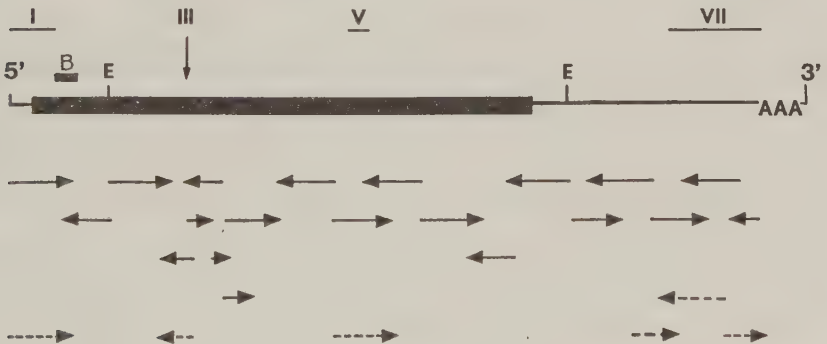


Abbildung 15 : Sequenzierungsstrategie der cDNA 1BHPk1. Die Pfeile zeigen Länge und Richtung der Sequenzgelablesungen. Gestrichelte Pfeile beziehen sich auf Kontrollsequenzierungen der cDNA 1BHPk2. Die kodierende Sequenz ist durch einen breiten Balken dargestellt, die zur Probe aus pBPhk-D1N komplementäre Sequenz ist durch ein B markiert. EcoRI-Schnittstellen sind durch ein E gekennzeichnet. Römische Ziffern bezeichnen Sequenzbereiche (vgl. Text und Abbildungen 16 und 17).

Abbildung 16:

Gesamtsequenz der cDNA β HPhk1 und abgeleitete Aminosäuresequenz.

Aminosäurepartialsequenzen, die sich von der Sequenz der Muskelform der β -Untereinheit unterscheiden, sind unterstrichen.

Im 5'-nichttranslatierten Bereich ist der kurze Leserahmen, in beiden nichttranslatierten Regionen sind die Stop-Codons im Leserahmen unterstrichen.

Beginn von Sequenzbereichen (vgl. Abb. 15 und 17) sind durch Pfeile; die Position, an der gegenüber der Muskelform der β -Untereinheit eine Deletion zu beobachten ist (s.u.), ist durch einen Doppelpfeil gekennzeichnet.

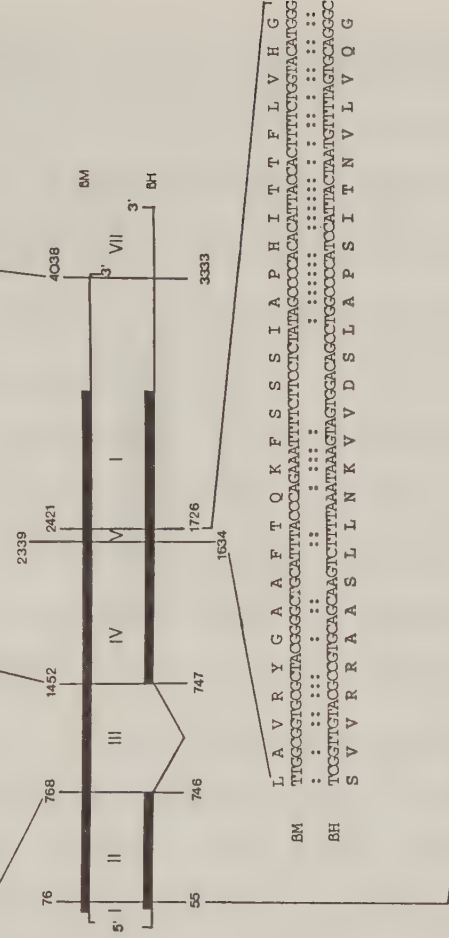
Abbildung 16 (vorige Seite) zeigt die Gesamtsequenz der cDNA 18HPhk1 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Die cDNA besteht aus einem 5'-nichttranslatierten Abschnitt von 162 Nukleotiden, einer kodierenden Sequenz von 2574 Nukleotiden und einem 3'-nichttranslatierten Abschnitt von 1203 Nukleotiden, an den sich ein poly(A)-Schwanz von zwölf Basen Länge anschließt. Die DNA des offenen Leserahmens kodiert für ein Protein von 858 Aminosäuren mit dem Molekulargewicht 97593 Da.

Abbildung 17 zeigt eine schematische Gegenüberstellung der beiden Klone p8Phk-D1N (Muskel) und 18HPhk1 (Herz) mit den sich unterscheidenden Partialsequenzen beider Klone. Die Sequenzen der cDNA-Moleküle für die β -Untereinheit aus weißem Kaninchenskelettmuskel und aus Herz unterscheiden sich in den Sequenzbereichen I, III, V und VII, wohingegen in den anderen Bereichen die Sequenzen identisch sind.

Der Sequenzbereich I reicht vom 5'-Ende des jeweiligen cDNA bis in den translatierten Bereich hinein (Nukleotid 75 bei der cDNA p8Phk-D1N bzw. Nukleotid 54 bei der cDNA 18HPhk1).

Der 5'-nichttranslatierte Bereich der cDNA aus dem Herzen ist bei weitem nicht so G+C-reich wie der entsprechende Abschnitt der cDNA aus dem Muskel (60 % gegenüber 97 %). Dem großen offenen Leserahmen gehen zwei Stop-Codons (beginnend bei Nukleotid -54 und -18) und ein kleiner offener Leserahmen im nichttranslatierten Bereich voraus (Nukleotide -112 bis -44).

	BM	SH
N L F G N Q G C	M R Y S N Q G P L E	
AACCTCTTGGC	AATCAGGCGGTCTG	
.....		
AACCTCTTGGC	AATCAGGCGGTCTG	
.....		
AACCTCTTGGC	AATCAGGCGGTCTG	
.....		
N L F G	N Q G P L E	



(M) A G A T G L M A E V S W K V L E R R A R T K R S G S
ATGGCGGCGGCGGCGGCTGTGCGGAGTGTCTGGAGGCTGTGGACCAAGCGCTGACGCTCA BM
GATTTAGATGCAATTGATGATGGCGGCTGAGCTGATGCTGTCTGTCCAGCGCTTGTAGTGTGCTGCA BH

Sequenzbereich III umfaßt die Nukleotide 769 bis 1432 in der cDNA der β -Untereinheit aus weißem Skelettmuskel. Dieser Bereich fehlt in der cDNA β HPhk1.

Sequenzbereich V besitzt eine Länge von 84 Nukleotiden in beiden cDNA- Molekülen. Die Sequenzen in diesem Bereich sind unterschiedlich, aber sehr ähnlich. Genau 50 % der Nukleotide in diesem Sequenzabschnitt und 42 % der Aminosäuren sind in beiden cDNAs gleich.

Sequenzbereich VII beginnt fünf Basen vor dem 3'- Ende der cDNA β HPhk-D1N. Diese letzten fünf Nukleotide stimmen mit der Sequenz der cDNA aus Herzmuskel nicht überein, der sich außerdem noch 439 Nukleotide in Richtung auf sein 3'-Ende hin weiter fortsetzt.

24 Nukleotide vor dem 3'-terminalen poly(A)- Bereich der cDNA β HPhk1 befindet sich ein Polyadenylierungssignal (ATAAAA).

Zur Überprüfung der von der Sequenz der cDNA aus Muskel abweichenden Sequenzabschnitte wurden diese durch Partialsequenzierungen einer zweiten cDNA aus Herz (β HPhk2) überprüft. Zwischen den beiden cDNAs β HPhk1 und β HPhk2 waren in diesen Partialsequenzen keine Unterschiede festzustellen. Insbesondere sind die 5'-terminalen und 3'-terminalen Partialsequenzen beider cDNAs identisch.

4.14. Hybridisierung humaner genomischer DNA mit
der cDNA des Klons p α Phk-D1

Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung eines
"Southern Blots" von humaner DNA (siehe 3.3.) mit cDNA
des Klons p α Phk-D1.

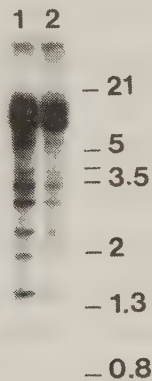


Abbildung 18:
"Southern Blot". Aufgetragen sind je 10 μ g PvuII-verdau-
ter humaner DNA. Spur 1 : Lymphoblastoide Zelllinie mit
dem Karyotyp 48, XXXX; Spur 2 : DNA aus Blutzellen mit
dem Karyotyp 46, XY. Am rechten Rand sind die Laufstrek-
ken von Standardfragmenten in kbp angegeben. Probe war
eine Mischung von Restriktionsfragmenten, die die gesamte
Sequenz der cDNA p α Phk-D1 abdecken. Die Markierung der
cDNA erfolgte wie unter 3.5.5.2. beschrieben und die
Hybridisierung wie unter 3.5.6. beschrieben.

In beiden Spuren sind identische Banden durch die Probe markiert, deren Größe im Bereich zwischen 1.4 kBp und etwa 10 kBp liegt. Bei Summation der Größe aller Banden ergibt sich für das Strukturgen der α -Untereinheit eine Mindestlänge von ungefähr 55 kBp.

Die Signale in Spur 1 sind sämtlich deutlich intensiver als entsprechende Signale in Spur 2. Dies spricht für eine Lage des Strukturgens der α -Untereinheit auf dem X-Chromosom.

Bisher ist kein bei einer Säugetierspezies auf dem X-Chromosom lokalisiertes Gen bekannt, das bei einer anderen Spezies autosomal lokalisiert ist (Ohno, 1973). Das Strukturgen der α -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase dürfte demnach bei allen Säugern auf dem X-Chromosom liegen.

Auf die Bedeutung dieser Tatsache für die Erklärung der molekularen Ursachen X-chromosomal vererbter Defizienzen dieses Enzyms wird im Diskussionsteil dieser Arbeit ausführlich eingegangen.

5. Diskussion

5.1. Klonierungsstrategie für cDNA- Moleküle

Es gibt grundsätzlich zwei Wege, cDNA- Moleküle zu einem bekannten Protein zu isolieren.

Im Rahmen der ersten Strategie wird ein immunologisches Nachweisverfahren verwendet. Die cDNA-Bank wird hierzu in einem Expressionsvektor angelegt und Translationsprodukte der gesuchten Klone werden spezifisch mit einem Antikörper markiert.

Ein anderer Weg zur Klonierung von bestimmten cDNA- Molekülen ist deren direkte Markierung mit zur gesuchten mRNA komplementären Oligonukleotiden. Hierzu sind als Vorabinformation Sequenzdaten von Peptiden des gesuchten Proteins notwendig.

In Vorabexperimenten muß im Einzelfall geklärt werden, welcher Weg mit den zur Verfügung stehenden Hilfsmitteln der erfolgsversprechendere ist.

Eine Immunmarkierung von Translationsprodukten kann in der Praxis auf Schwierigkeiten stoßen. Der Grund hierfür ist, daß Antikörper gegen Epitope des reifen Proteins gerichtet sind. Solche Epitope können aber unter Umständen im primären Translationsprodukt noch fehlen, zum Beispiel im Falle posttranslationaler Modifikation des Proteins.

Auch im Falle der Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten kann beobachtet werden, daß weder ein monoklonaler Anti-

körper noch ein Antiserum gegen Phosphorylase- Kinase das primäre Translationsprodukt der α - Untereinheit fällen kann. Die Präzipitierung des primären Translationsprodukts der β - Untereinheit gelingt nur mit dem Antiserum (vgl. 4.2.). Posttranslationale Modifikationen der großen Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase wie zum Beispiel Phosphorylierungen von Serinresten ("endogenes Phosphat") könnten hierfür verantwortlich sein. Ein immunologisches Verfahren zur Klonierung der großen Untereinheiten von Phosphorylase- Kinase scheint somit weniger geeignet zu sein.

Die zweite mögliche Klonierungsstrategie über die direkte Markierung von cDNA- Molekülen empfiehlt sich immer dann, wenn wie im vorliegenden Fall bereits Sequenzdaten aus Peptiden des zu klonierenden Proteins vorliegen. Die mRNA- Sequenzen, die für diese Peptidsequenzen kodieren, können abgeleitet und dazu komplementäre Oligonukleotide synthetisiert werden. Jedoch eignen sich in der Praxis aufgrund der Degenerierung des genetischen Kodes nicht alle Peptidsequenzen zum Entwurf von Oligonukleotidproben.

Die in einem Hybridisierungsexperiment erzielte Spezifität der Markierung bestimmter cDNA- Klone mit einer bestimmten Probe hängt stark von der Länge dieser Probe, ihrem Degenerierungsgrad und ihrem G+C- Gehalt ab.

Gerade bei kurzen und stark degenerierten Proben treten häufig "falsch positive" Signale auf, die auf unspezifi-

schen Hybridisierungen beruhen. Eine experimentelle Trennung dieser "falsch positiven" von den gesuchten Signalen aufgrund der verschiedenen Hybridisierungseigenschaften ist oft kaum möglich.

Dies war auch bei den Hybridisierungen von mRNA- Präparationen im "Northern Blot" mit den Oligonukleotiden zu beobachten, die komplementär zu Abschnitten der mRNA der Phosphorylase- Kinase- Untereinheiten sind. Nur bei der α -Untereinheit gelang die spezifische Markierung ein und derselben mRNA- Spezies mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden. Bei Verwendung der anderen Proben zeigte sich entweder überhaupt keine spezifische Markierung oder aber die markierten mRNA- Spezies kamen aufgrund ihrer zu geringen Größe nicht als Phosphorylase- Kinase- mRNAs in Frage ("falsch positive" Signale).

Die eine gemeinsame Bande im "Northern Blot" markierenden Oligonukleotidproben A4 und A5 führten zur erfolgreichen Klonierung der α - Untereinheit von Phosphorylase-Kinase. Die Klonierung der β - Untereinheit gelang mit Hilfe der Probe B3, obwohl diese im "Northern Blot" kein entsprechendes spezifisches Signal zeigte.

Die Identität der Klone ist durch Übereinstimmung mit strukturellen Daten auf der Ebene des Proteins gesichert. Die Aminosäurezusammensetzung der Untereinheiten, die experimentell gefunden wurde, stimmt sehr gut mit der aus der cDNA- Sequenz abgeleiteten überein (siehe 4.9.1. und 4.9.2.).

Jeweils fast die Hälfte der aus den cDNA-Klonen abgelei-

teten Proteinsequenzen konnte durch Peptidsequenzierungen bestätigt werden, darunter die aminoterminalen und carboxyterminalen Sequenzabschnitte der beiden Untereinheiten.

Vergleich der Länge der sequenzierten cDNA- Klone mit ihrem jeweiligen Hauptmarkierungsprodukt im "Northern Blot" von mRNA aus demselben Gewebe zeigt außerdem, daß die Klone nahezu vollständige Kopien der jeweiligen mRNA sind.

5.2. Gewebespezifische Isoformen der Untereinheiten

α und β von Phosphorylase- Kinase

Phosphorylase-Kinase aus anderen Geweben als dem weißen Skelettmuskel ist von einer Reihe von Arbeitsgruppen aufgereinigt worden.

Jennissen und Heilmeyer (1974) beschreiben die Isoform aus dem roten Skelettmuskel des Kaninchens. Diese Form enthält anstelle der α -Untereinheit eine um 5 kDa verkleinerte, sogenannte α' -Untereinheit. Die anderen Untereinheiten komigrieren gelelektrophoretisch mit den entsprechenden Polypeptiden aus weißem Skelettmuskel.

Chrisman et al. (1982) gelang die Aufreinigung des Enzyms aus Rattenleber. Die beiden großen Untereinheiten dieser Enzymform sind gelelektrophoretisch von den entsprechenden Untereinheiten aus der Muskelform ununterscheidbar. Phosphorylase- Kinase aus Leber besitzt jedoch deutlich andere enzymatische Eigenschaften.

Die pH- Optima der nichtaktiven Formen des Enzyms aus Leber und Muskel differieren stark (Vandenneede et al., 1979); die Aktivität der Leberform des Enzyms ist nicht im selben Ausmaß calciumabhängig wie die Muskelform (van den Werve et al., 1977). Die Aktivierung von Phosphorylase-Kinase in der Leber erfolgt entweder über Glucagon als primären und cAMP als sekundären "messenger" (Vandenneede et al., 1979) oder, alternativ dazu, über Adrenalin (α -adrenerge Rezeptoren) oder Vasopressin als primäre und

Calcium als sekundären "messenger" (van de Werve et al., 1977; Sakai et al., 1978).

Die katalytische γ - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase aus Leber zeigt eine molekulare Heterogenität. Es treten im Gel zwei Banden auf, von denen eine mit der γ - Untereinheit aus weißem Skelettmuskel komigriert (Chrisman et al., 1982).

Burchell et al. (1976) beschreiben die Immunpräzipitation von Phosphorylase- Kinase aus Kaninchenherz, Angelos et al. (1986) gelang die Immunpräzipitation aus Rattenherz. Cooper et al. (1980) berichten über die Aufreinigung des Enzyms aus Rinderherz. Die β - Untereinheit aus allen Präparationen zeigte dieselbe Größe wie die β - Untereinheit des Enzyms aus dem entsprechenden weißen Muskelgewebe. Burchell et al. fanden im Kaninchenherz ausschließlich eine um 5 kDa gegenüber der Untereinheit aus weißem Kaninchenmuskelgewebe verkleinerte α' - Untereinheit, wohingegen Angelos et al. (1986) neben dieser α' - Isoform auch einen kleinen Anteil eines mit der α - Untereinheit aus weißem Skelettmuskel komigrierenden Polypeptids aus dem Herzgewebe der Ratte immunpräzipitieren konnten.

Daegelen-Proux et al. (1976) trennten aus einem Homogenat des Kaninchenherzens über eine Pevikon- Elektrophorese zwei Proteinfractionen mit Phosphorylase- Kinase- Aktivitäten voneinander, die unterschiedlich geladene Proteine enthalten.

5.2.1. Differenzen zwischen strukturellen Daten auf Protein- und cDNA- Ebene der α - und β - Untereinheiten aus Herzmuskel

Die oben dargestellten auf Proteinebene gewonnenen Strukturdaten von Phosphorylase- Kinase aus dem Herzen unterschiedlicher Spezies widersprechen den aus der cDNA der Klone 1α HPhk1 und 1β HPhk1 abgeleiteten Aminosäuresequenz der großen Untereinheiten von Phosphorylase- Kinase aus dem Kaninchenherzen.

Burchell et al. konnten aus dem Kaninchenherzen ausschließlich die verkleinerte α' - Untereinheit isolieren, die cDNA- Daten sprechen aber für eine im Vergleich zur entsprechenden Untereinheit aus Muskel unverkleinerte α - Untereinheit.

Denkbar ist jedoch, daß im Herzmuskel beide Formen existieren oder daß das α' - Polypeptid ein proteolytisches Abbauprodukt der α - Untereinheit ist. Die experimentelle Trennung zweier Phosphorylase-Kinase- Aktivitäten im Kaninchenherzen (Daegelen-Proux et al., 1976) könnte ein Hinweis auf das Vorkommen zweier Isoformen des Enzyms im Herzen sein.

Die Möglichkeit, daß es sich bei der verkleinerten α' - Untereinheit im Herzen um ein proteolytisches Abbauprodukt handelt, bleibt jedoch offen. Angelos et al.(1986) finden bei der Immunpräzipitation von Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten aus Rattenherz neben der verklei-

nerten α' - Untereinheit auch einen kleinen Anteil der unverkleinerten α -Form. Die Sequenzierung des cDNA-Klons $\lambda\alpha$ HPhk1 im Rahmen dieser Arbeit spricht für die Existenz des unverkleinerten Proteins der α -Untereinheit im Herzen, schließt jedoch die Koexistenz einer anderen Isoform der α -Untereinheit in diesem Gewebe nicht aus. Die Isolierung weiterer Klone für die α - Untereinheit aus einer neu anzulegenden cDNA- Bank aus dem Kaninchenherzen soll diese offene Frage klären.

Ein erheblicher Unterschied ergibt sich bei der Größe der β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase aus dem Herzen. Alle Autoren, die Phosphorylase- Kinase aus dem Herzmuskel unterschiedlicher Spezies aufgereinigt haben, stellten eine im Vergleich zur Isoform aus weißem Skelettmuskel in ihrer Größe unveränderte β - Untereinheit fest. Hingegen unterscheidet sich das aus der cDNA- Sequenz der Klone $\lambda\beta$ HPhk1 und $\lambda\beta$ HPhk2 abgeleitete Polypeptid von der β -Untereinheit aus weißem Muskel durch den Austausch zweier kurzer Sequenzabschnitte und eine große Deletion in der Mitte des Moleküls, die etwa 20 % der gesamten kodierenden Sequenz ausmacht. Das entsprechende Polypeptid von 97.5 kDa konnte bei keinem der beschriebenen Aufreinigungsverfahren im Herzen gefunden werden.

Dies legt den Gedanken eines Klonierungsartefaktes nahe. Hiergegen ist einzuwenden, daß die Klonierung von sechs Klonen der β - Untereinheit aus Kaninchenherz mit übereinstimmendem Restriktionsmuster eine hinreichende Absicherung gegen ein seltenes Ereignis wie ein Klonierungsarte-

fakt bietet. Dies wiederum gilt aber nur dann, wenn die isolierten Klone voneinander unabhängig sind. Die völlig übereinstimmende Länge der beiden sequenzierten Klone könnte jedoch dafür sprechen, daß diese cDNA- Moleküle nicht unabhängig sind.

Es ist auffällig, daß die Deletion im Klon 18HPhk1 und die sich an diese Deletion 3'-wärts anschließende cDNA-Sequenz mit demselben Dekanukleotid CAATCAGGGC beginnen (vgl. Abbildung 17, Sequenzbereich 3). Es kann spekuliert werden, daß diese strukturelle Eigenschaft der mRNA im Verlauf der cDNA- Synthese oder - Klonierung zur Deletion des dazwischenliegenden Sequenzabschnitts geführt hat.

5.3. Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der großen Untereinheiten von Phosphorylase- Kinase

5.3.1. Homologie der beiden Untereinheiten

Sequenzvergleich der α - und β - Untereinheiten von Phosphorylase- Kinase zeigt, daß diese beiden Untereinheiten homolog sind (vgl. 4.10.). Sie zeigen dabei einen Aufbau aus einerseits zueinander homologen und andererseits für je eine Untereinheit spezifischen strukturellen Domänen (siehe Abbildung 11). Das Hydropathieprofil und die Sekundärstrukturpotentiale beider Untereinheiten sind in der homologen Domäne B gut konserviert. In den beiden kürzeren homologen Domänen D und F ist die Konservierung der Sekundärstruktur nicht sehr groß. Eine Ausnahme bildet das in der C-terminalen Domäne F gut konservierte α -Helixpotential. Eine strukturelle Ähnlichkeit bestimmter Bereiche spricht für eine ähnliche Funktion dieser Domänen; die Homologie der beiden Untereinheiten insgesamt läßt vermuten, daß ihre regulatorischen Funktionen im Holokomplex prinzipiell ähnlich sind. Es ist auffällig, daß die für je eine Untereinheit spezifischen Domänen A, C und E insgesamt deutlich hydrophiler sind als die homologen Domänen B, D und F. Es kann spekuliert werden, daß die hydrophoberen, zwischen beiden Untereinheiten konservierten Domänen im Inneren der Tertiärstruktur

liegen oder Funktionen im Bereich der Interaktion zwischen den Untereinheiten wahrnehmen, wohingegen die spezifischen und hydrophileren Domänen für die Kommunikation der jeweiligen Untereinheit mit der wäßrigen Umgebung sorgen.

Eine möglicherweise ähnliche Tertiärstruktur beider Untereinheiten spricht für ähnliche räumliche Positionen im hexadekameren Komplex. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Trempe et al., 1986, Schramm and Jennissen, 1985) führten zu dem Ergebnis, daß der Phosphorylase-Kinase-Holokomplex einen symmetrischen Aufbau aus zwei Octameren $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$ besitzt. Der Komplex ähnelt zwei entgegengesetzten Klammern, die durch zwei kurze Brücken miteinander verbunden sind.-

Es ist wünschenswert, den einzelnen, zunächst nur strukturell definierten Domänen je einzelne Funktionen zuzuordnen. In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels werden dazu einige Voraussagen versucht.

Mit Blick auf die Evolution von Phosphorylase-Kinase liegt die Vermutung nahe, daß die Strukturgene beider Untereinheiten sich durch Genduplikation aus einem Ursprungsgen gebildet haben. Anschließende Divergenz führte dann jeweils über einen strukturellen Umbau (Gewinn oder Verlust von Exons) zu verschiedenen Genprodukten unterschiedlicher, aber immer noch ähnlicher Funktion.

5.3.2. Kein zusätzliches katalytisches Zentrum

Die katalytischen Untereinheiten oder Domänen einer großen Zahl von Proteinkinasen sind in ihrer Sequenz bekannt (Hunter, 1987; Hanks et al., 1988). Sie haben in der Regel eine Länge von 250 bis 300 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa. Proteinkinasen können anhand ihrer Regulation in von zyklischen Nukleotiden abhängige, Calcium-/Phospholipid- abhängige und Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinasen eingeteilt werden.

Katalytische Untereinheiten oder Domänen aller bisher beschriebenen Proteinkinasen sind untereinander homolog und zeigen weite Bereiche von konservierten Aminosäuresequenzen. Serin-/Threoninkinasen zeichnen sich gegenüber Tyrosinkinasen durch einige für sie spezifische Sequenzabschnitte aus. Typisch für alle Proteinkinasen ist eine glycinreiche Struktur mit der Konsensussequenz GXGXXG. Ein etwa 10 Reste stromab gelegenes Lysin ist direkt am Transfer der Phosphatgruppe auf das Proteinsubstrat beteiligt (Kamps et al., 1984).

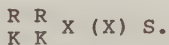
In beiden klonierten Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase konnten die Konsensussequenzen, die für katalytische Untereinheiten von Proteinkinasen typisch sind, nicht gefunden werden. Die Existenz eines weiteren katalytischen Zentrums dieses Enzyms auf einer der beiden großen Untereinheiten (zusätzlich zu dem auf der γ - Untereinheit), die lange Zeit diskutiert worden ist, ist

daher sehr unwahrscheinlich.

Auch Sequenzähnlichkeiten zu regulatorischen Untereinheiten anderer Proteinkinasen oder zu beliebigen anderen, in ihrer Sequenz bekannten Proteinen weisen die Phosphorylase- Kinase- Untereinheiten nicht auf.

5.3.3. Aktivierung von Phosphorylase- Kinase durch cAMP- abhängige Proteinkinase

cAMP- abhängige Proteinkinase phosphoryliert spezifisch Serinreste in einer Reihe von Proteinen, unter anderem den Histonen H1 und H2B, Pyruvatkinase und Phosphorylase- Kinase (Yeaman et al., 1977). Bei Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen in der Umgebung des jeweilig phosphorylierten Serins aus all diesen Substraten ergibt sich als Konsensussequenz:



Das Enzym scheint nur solche Serine phosphorylieren zu können, die in einer Entfernung von einer oder zwei Aminosäuren in Richtung auf den Aminoterminus mindestens zwei basische Aminosäuren besitzen. Eine Ausnahme von dieser Regel ist allerdings die von Garton et al. (1988) kürzlich beschriebene in-vitro-Phosphorylierung des ersten Serins im Peptid KTEPMRRSVS aus einer hormonsensitiven Lipase des Rinds durch cAMP-abhängige Proteinkinase.

In vitro- Experimente zeigen, daß die cAMP- abhängige Proteinkinase bei einer Konzentration von 1mM MgCl₂, 2 Mol Phosphat in jedes Tetramer Phosphorylase- Kinase einbauen kann (Singh and Wang, 1977). In die beiden Untereinheiten α und β werden ungefähr gleiche Mengen Phosphat eingebaut, die Phosphorylierung der β - Untereinheit vollzieht sich jedoch viel schneller und führt zur Aktivierung des Enzyms. Die darauf folgende Phosphorylierung auch der α - Untereinheit führt zur Dephosphorylierung von Serin 26 der β - Untereinheit durch Phosphorylase-Kinase-Phosphatase und, als Folge davon, zur Deaktivierung der Phosphorylase- Kinase (Cohen et al., 1975). In vitro wird jeweils nur ein Serin pro α - (Serin 1018) und β - (Serin 26) Untereinheit durch die cAMP- abhängige Proteinkinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung dieser Serine in einer Stöchiometrie von 50-100 % konnte auch in vivo als Folge einer Adrenalingabe gezeigt werden (Yeaman and Cohen, 1975); ob neben den in vitro von der cAMP-abhängigen Proteinkinase erkannten Positionen in vivo noch andere Serine von dieser Kinase erkannt werden, ist jedoch unbekannt.

In der α - Untereinheit befindet sich das von der cAMP- abhängigen Proteinkinase in vitro und in vivo erkannte Serin in der "Multiphosphorylierungsdomäne", die für die α - Untereinheit spezifisch ist (vgl. 5.3.4.). Dieses Serin 1018 ist ebenfalls zu einem geringen Anteil (etwa 15 %) endogen phosphoryliert (Meyer et al., Manuskript

eingereicht). Ein weiteres Serin, das die strukturellen Voraussetzungen für eine Erkennung durch die cAMP- abhängige Proteinkinase besitzt, ist Serin 431 (Aminosäureumgebung RRFS), jedoch konnte eine Phosphorylierung dieses Serins durch die cAMP- abhängige Proteinkinase bisher nicht beobachtet werden.

In der β - Untereinheit erfüllen zwei Serine die strukturellen Voraussetzungen für eine Erkennung durch die cAMP- abhängige Proteinkinase : Serin 26, das durch das Enzym auch tatsächlich in vitro und in vivo phosphoryliert wird und Serin 700. Beide Serine werden auch von Phosphorylase- Kinase selbst phosphoryliert (Meyer et al., Manuskript eingereicht), zusätzlich enthält Serin 700 im Gegensatz zu Serin 26 bereits 0.5 Mol/Mol endogenes Phosphat. Ob und in welchem Ausmaß eine Phosphorylierung von Serin 700 durch die cAMP- abhängige Proteinkinase in vivo zur Aktivierung von Phosphorylase- Kinase beiträgt, ist noch zu untersuchen.

Anders als in der Muskelisoform von Phosphorylase- Kinase baut die cAMP-abhängige Proteinkinase in die Herzisoform des Enzyms des Rinds nur 1 Mol Phosphat pro Mol Hexadekamer in die β - Untereinheit(en) ein (Sul et al., 1981). Es ist unbekannt, ob dieser Einbau zu gleichen Teilen in alle vier β -Untereinheiten des Komplexes erfolgt oder nicht. Als Ursache für die verminderte Phosphorylierung der β - Untereinheiten ist das Vorkommen einer im Vergleich zum Muskelgewebe in ihrer Struktur veränderten β - Untereinheit denkbar. Diese könnte in den Enzymkomplexen

des Herzens die β - Isoform, die im Muskel vorrangig vorkommt, vollständig oder teilweise ersetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Klonierung einer β - Isoform aus Kaninchenherz gelungen. Beruht der Verlust eines erheblichen Anteils der Sequenz im Vergleich zur Muskelform auch vermutlich auf einem Artefakt (siehe 5.2.1.), so bleibt doch festzuhalten, daß die Isoform aus Herz sich außerdem durch den Austausch zweier Sequenzabschnitte von der Muskelisoform dieser Untereinheit unterscheidet. Der aminoterminal ausgetauschte Sequenzbereich umfaßt auch die Serinposition 26 und ihre Umgebung (siehe Abbildung 17, Sequenzbereich I).

	17							P
Muskelisoform	<u>R</u>	R	A	<u>R</u>	T	K	R	S G S
Herzisoform	S	P	P	A	F	<u>L</u>	<u>R</u>	S G S
	11							

Von den beiden dem Serin 26 im Abstand von zwei Positionen vorangehenden basischen Aminosäuren K und R ist nur das proximale R erhalten; Serin 20 der β - Herzisoform erfüllt somit die strukturellen Voraussetzungen für eine Phosphorylierung durch die cAMP- abhängige Proteinkinase entweder gar nicht mehr oder nur noch in sehr geringem Maße.

Dies könnte eine Erklärung für das geringere Ausmaß der Phosphorylierung der β - Untereinheiten von Herz- Phosphorylase- Kinase durch diese Proteinkinase sein. Ob der verminderte Einbau von Phosphat in die β - Untereinheiten

im Herzen auf einer Erkennung der zweiten potentiellen Erkennungsstelle für die cAMP- abhängige Proteinkinase (entsprechend dem Serin 700 in der β -Muskelform) oder einer molekularen Heterogenität der β - Untereinheiten in den Phosphorylase- Kinase- Holokomplexen des Herzens beruht, ist noch unbekannt.

5.3.4. Endogene Phosphoserine und Autophosphorylierungsstellen

Phosphorylase-Kinase enthält im nichtaktivierten Zustand bis zu 20 Mol Phosphat/ Hexadekamer. Auf die Aktion welcher Proteinkinasen der Einbau dieser Phosphatreste zurückgeht, ist genauso unbekannt wie die funktionelle Bedeutung dieser "endogenen Phosphate". Jede α -Untereinheit enthält 2.5 Mol Phosphat, jede β - Untereinheit 2.3 Mol (Crabb and Heilmeyer, 1984).

Unter sättigender Calciumkonzentration und bei pH 6.8 werden sowohl die α - als auch die β - Untereinheit an je mindestens drei Serinresten autophosphoryliert. Die physiologische Relevanz der Autophosphorylierung in vivo ist nicht bekannt. Meyer et al. gelang die Lokalisierung einer Reihe von endogen oder durch Phosphorylase- Kinase selbst phosphorylierten Serinen in Peptiden der α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase (Meyer et al., 1988; Meyer et al., Manuskript eingereicht); im Rahmen dieser Arbeit ist nun eine Lokalisierung in der gesamten

Primärstruktur dieser Untereinheiten möglich.

Es handelt sich um je drei Autophosphorylierungsstellen in jeder Untereinheit sowie vier endogen phosphorylierte Serine in der α - und zwei endogen phosphorylierte Serine in der β - Untereinheit.

Geladene Aminosäuren in der Umgebung von zu phosphorylierenden Serinresten sind von entscheidender Bedeutung für die Erkennung der jeweiligen Position durch verschiedene Proteinkinasen.

So beschreiben Yeaman und Cohen (1977) die Substratspezifität von cAMP- abhängiger Proteinkinase (siehe 5.3.3.). Proteinkinase C benötigt zur Erkennung eines Serins eine basische Aminosäure in einer Entfernung von zwei bis drei Resten in C- Richtung (Kishimoto et al., 1985). Die Calcium-/Calmodulin- abhängige Proteinkinase II erkennt Serine und Threonine, denen in einem Abstand von drei Resten eine basische Aminosäure vorausgeht (Thiel et al., 1988).

Die Erkennungsstelle von Phosphorylase b für Phosphorylase- Kinase besitzt in beiden Richtungen in einer Entfernung von zwei bis drei Resten eine basische Aminosäure (K K K Q I S(P) V R G), das in Glykogen- Synthase von der Phosphorylase- Kinase erkannte Serin besitzt auf der N-terminalen Seite in einer Entfernung von zwei Aminosäuren ein Arginin (P L S R T L S(P) V S S L, Picket- Gies and Walsh, 1986).

Saure Aminosäuren in Nachbarschaft des zu phosphorylierenden Serins sind erforderlich für eine Erkennung durch

Caseinkinasen (Tuazon et al., 1979). Caseinkinase I benötigt eine Glutaminsäure zwei Aminosäuren in N- Richtung vom Serin entfernt. Caseinkinase II benötigt mindestens zwei saure Reste unmittelbar in C- Richtung vom der zu erkennenden Position; diese Kinase zieht allerdings ein Threonin als Phosphorylierungsstelle einem Serin vor. Im Licht dieser strukturellen Erfordernisse für die Erkennung von Serinresten durch Proteinkinasen lassen sich die in den Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase lokalisierten Serine in verschiedene Klassen einteilen:

Autophosphorylierung (alpha)	P	
	PAISIHEIG	α 985
	GIMQLKSEIK	α 1007
	EFGVERSVRP	α 972
Autophosphorylierung (beta)	P	
	GLMAEVSWKV	β 11
	RTKRSGSVYE	β 26
Auto- und endogene Phosphorylierung(beta)	P	
	KVKRQSSTSN	β 700
Endogene Phospho- rylierung (alpha)	P	
	RRLSI-	α 1018
	STE-	α 1020
	SQP-	α 1023
	NGGHS LGAD	α 1030.
Endogene Phospho- rylierung (beta)	P	
	SNEDSCLVS	β 1088

Serine 26 und 700 in der β - Untereinheit sowie Serin 1018 in der α - Untereinheit erfüllen die Voraussetzungen für

eine Phosphorylierung durch die cAMP- abhängige Protein-kinase (Diskussion siehe oben). Diese Serine können auch von der Calcium-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II erkannt werden.

Die Autophosphorylierungsstellen 811 und α 972 haben sowohl die für ein Substrat der Proteinkinase C als auch die für ein Substrat der Caseinkinase I typische Primärstrukturumgebung. Serin 1088 in der β - Untereinheit ist ein mögliches Substrat für Caseinkinase I ; Serin 1007 in der α -Untereinheit ist ein mögliches Substrat für Proteinkinase C.

Bis auf zwei Ausnahmen liegen alle bisher lokalisierten Phosphoserine in für eine Untereinheit spezifischen Domänen. Die Bedeutung dieser Beobachtung für die Evolutionsgeschichte der Phosphorylase-Kinase wurde bereits unter 5.3.1. diskutiert.

Die sieben in der α - Untereinheit lokalisierten Phosphoserinpositionen befinden sich ausnahmslos in der prolin- und serinreichen Domäne E innerhalb eines Sequenzbereichs von nur 60 Aminosäuren. Eine solche Häufung von Phosphorylierungsstellen mit unterschiedlichen Substrateigenschaften ist auch von anderen Proteinen bekannt, zum Beispiel der Glykogensynthase (Picton et al., 1982) oder dem Rhodopsin (Benovic et al., 1986).

Interaktionen zwischen verschiedenen benachbarten Phosphorylierungsstellen könnte auf molekularer Ebene die Integration verschiedener Signale, die bei Phosphorylase-

Kinase zu beobachten ist, und die Feinsteuerung ihrer Funktion erklären. Die Phosphorylierungen verschiedener Positionen durch dieselbe oder aber auch verschiedene Proteinkinasen könnten dabei voneinander unabhängig sein oder sich gegenseitig beeinflussen. Hierbei sind synergistische oder antagonistische Effekte denkbar.

Die Multiphosphorylierungsdomäne E der α - Untereinheit befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft einer vorhergesagten Calmodulin- Bindungsstelle; die beiden phosphorylierbaren Serine 11 und 26 der β - Untereinheit sind sogar Bestandteil einer für diese Untereinheit vorhergesagten Calmodulinbindungshelix in der für die β - Untereinheit spezifischen Domäne A (vergleiche folgender Abschnitt). Es ist somit denkbar, daß diese Domänen der Ort einer Wechselwirkung zwischen den beiden Mechanismen der Regulation - Proteinphosphorylierung und Calciumbindung - von Phosphorylase-Kinase sind.

Eine solche Wechselwirkung ist auch bei der Calcium-/Calmodulin- abhängigen Proteinkinase II bekannt. Bei diesem Enzym führt die Autophosphorylierung von Threoninen in der Nachbarschaft von Calmodulinbindungsstellen im Unterschied zu Phosphorylase-Kinase zu einer Calcium-unabhängigen Form der Kinase (Thiel et al. 1988).

5.3.5. Calmodulinbindungsstellen

Phosphorylase- Kinase kann neben seinen fest integrierten δ -Untereinheiten weiteres exogenes Calmodulin (δ') binden. "Crosslinking"- Experimente zeigen, daß die beiden großen Untereinheiten daran beteiligt sind, wobei die β - Untereinheit überwiegt (Cohen et.al, 1979; Picton et al., 1980). Bekannte calmodulinbindende Peptide besitzen Sequenzen, die reich an hydrophoben und basischen Aminosäuren sind, und bilden eine basische, amphiphile α - Helix . Die N-terminale Hälfte dieser Helix enthält oft ein Tryptophan, die C-terminale Hälfte enthält in manchen Fällen mehrere Serinreste (Buschmeier et al., 1987).

In den Primärsequenzen der α - und β - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase befinden sich je zwei homologe Sequenzabschnitte, die diese Bedingungen erfüllen (vergleiche Abbildungen 11 und 12). Diese Sequenzbereiche sind arm an sauren Aminosäuren und Prolin. Es liegt jeweils ein regelmäßiges Muster von basischen und hydrophoben Aminosäuren vor.

Außerdem erfüllt der Aminoterminus der β - Untereinheit die strukturellen Voraussetzungen für eine Interaktion mit Calmodulin. Da diese Domäne ebenfalls zwei phosphorylierbare Serine trägt, ist sie möglicherweise der Ort einer Interaktion zwischen den Effekten der verschiedenen Signale auf die Aktivität von Phosphorylase- Kinase.

Zur Zeit ist eine Interaktion nur der γ - Untereinheit mit

dem endogenen Calmodulin bekannt (Picton et al., 1980). Die Existenz weiterer Calmodulinbindungsstellen in der α - und β - Untereinheit könnte dafür verantwortlich sein, daß Calmodulin - anders als im Fall anderer Calcium-/ Calmodulin-abhängiger Proteinkinasen - auch ohne gebundenes Calcium Bestandteil des Phosphorylase- Kinase-Komplexes bleibt. Abbildung 19 zeigt die Sequenzen bekannter calmodulinbindender Proteindomänen aus Kaninchenmuskeln und die Partialsequenzen aus Domänen der Phosphorylase- Kinase- Untereinheiten, die möglicherweise Calmodulin binden können, im Vergleich:

- 1) LLKKYLMKRRWKNFIAVSAANRFKKISSSGALM
- 2) KLRGRSFMNNWEVYKLLAHIRPPAPKSGSYTVAVM
- 3) AGATGLMAEVSWKVLERRATKRSGSVYE
- 4) LYGKVGKIRHWGLIRYISGILRKKVEA
- 5) RLYRRAGSKKLWLAVRYGAAFTQKFSS
- 6) RQGWQRRRRLDGALNRVPIGFYGKVWKVLOK
- 7) NGRCWLNKRQIDGSLNRTPTGFYDRVWQILER

Abbildung 19:

Calmodulinbindungsdomänen : 1) Kaninchenskelettmuskel "Myosin Light Chain Kinase" nach Blumenthal et al., 1985;
 2) Phosphofructokinase nach Buschmeier et al., 1987;
 3) bis 7) Phosphorylase- Kinase- Untereinheiten:

- 3) β 1- β 29
- 4) α 810 - α 840
- 5) β 767 - β 794
- 6) α 1064 - α 1096
- 7) β 919 - β 950.

Aromatische Aminosäuren sind fett gedruckt, basische Aminosäuren sind einfach, hydrophobe Aminosäuren sind doppelt unterstrichen.

Ein funktionelles Modell für den Mechanismus der Aktivierung einer Proteinkinase durch Calmodulin ist das Pseudo-substratmodell, das am Beispiel der "Myosin Light Chain Kinase" entwickelt wurde. Pearson et al. (1988) stellten eine Homologie dieser Kinase im Bereich ihrer Calmodulin-Bindungsstelle mit ihrem Substrat, der leichten Kette des Myosins fest. Hierbei sind geladene Reste in der Umgebung des zu phosphorylierenden Serins der Myosinkette in der Proteinkinase konserviert, das Serin selbst jedoch nicht. Nach ihren Vorstellungen blockiert die Calmodulinbindungsstelle der Kinase als "Pseudosubstrat" das eigene katalytische Zentrum. Calmodulin-Bindung an diese Domäne führt zu einer Änderung der Tertiärstruktur, in dessen Folge das "Pseudosubstrat" sich vom katalytischen Zentrum entfernt, das somit frei für das eigentliche Substrat wird.

Im Falle der Phosphorylase-Kinase ist Calmodulin auch im calciumfreien Zustand Bestandteil des Holokomplexes. Jedoch ist vorstellbar, daß die Bindung von Calcium durch Calmodulin allosterisch die Tertiärstruktur der großen Untereinheiten verändert und so die Interaktion einer "Pseudosubstratdomäne" mit der katalytischen Untereinheit beeinflusst. Es liegt also nahe, in den Calmodulin bindenden großen Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase nach Homologien mit dem Substrat Phosphorylase b zu suchen.

Es findet sich in jeder Untereinheit ein Sequenzbereich, in dem die Positionen der strukturell bedeutsamen basi-

schen Aminosäurereste im Vergleich zur Sequenz der durch Phosphorylase-Kinase erkannten Partialsequenz der Phosphorylase recht gut erhalten sind.

	1063		1076
α -Untereinheit	S R Q G Q W Q R R R R L D G		
	:	:	:
Phosphorylase b	S R P L S D Q E K R K Q I S(P)		
	:	:	:
β - Untereinheit	M L G N I D Q P K Y R Q I V		
	985		999

Die Homologie zwischen den Phosphorylase-Kinase-Partialsequenzen und Phosphorylase in diesem Bereich ist insgesamt nicht sehr groß. Die basischen Positionen sind jedoch gut konserviert. Die Partialsequenz aus der α -Untereinheit ist Bestandteil einer möglichen Calmodulinbindungsstelle, die Partialsequenz aus der β -Untereinheit befindet sich in der Nähe einer möglichen Calmodulinbindungsstelle. Es läßt sich vermuten, daß im Fall der Phosphorylase-Kinase ein ähnlicher Regulationsmechanismus vorkommt wie im Fall der "Myosin Light Chain Kinase".

5.3.6. Bindung von Nukleotiden

Nukleotidbindende Abschnitte von Proteinen besitzen eine ähnliche Primärstruktur. ATP- Bindungsstellen von Protein-kinasen zeichnen sich durch die Konsensussequenz GXGXXGX₈₋₁₅VAXK aus (siehe oben) . Andere ATP- bindende Proteine wie Adenylatkinase, Myosin oder Thymidinkinase besitzen ebenfalls eine glycinreiche Partialsequenz und ein sich direkt daran anschließendes Lysin, wobei die Abstände zwischen den einzelnen Glycinen nicht streng konserviert sind (Fry et al., 1986).

Die α - Untereinheit von Phosphorylase- Kinase wird spezifisch am Lysin 588 von Fluoresceinisothiocyanat markiert; diese Reaktion wird durch ATP inhibiert.

Andere ATP- Affinitätsliganden markieren die β - Untereinheit; ADP hat einen allosterischen Effekt auf Phosphorylase- Kinase und beeinflusst die Konformation der β - Untereinheit (Cheng et al., 1985).

Das typische Konsensusmotiv GXGXXGK für eine Nukleotidbindungsstelle kann in beiden Primärsequenzen nicht gefunden werden. Zwei glycinreiche, dem Konsensusmotiv verwandte Motive befinden sich in für beide Untereinheiten konservierten Domänen:

GVLGTSK	α 502 - α 509
GCLGTSK	β 556 - β 562
KMDQGYFGGAR	α 588 - α 598
KNGMIGG	β 643 - β 649

Die zweite Partialsequenz beinhaltet das in der α - Untereinheit spezifisch durch Fluoresceinisothiocyanat markierte Lysin. Dies legt den Gedanken nahe, daß es sich hier um eine nukleotidbindende Subdomäne der α -Untereinheit handeln könnte.

Das entsprechende Lysin in der β - Untereinheit (K 643) ist jedoch durch diesen Affinitätsliganden nicht markierbar.

Die Homologie zu bekannten Nukleotidbindungsstellen ist allerdings in beiden Untereinheiten nicht überzeugend. Bekannte Partialsequenzen mit der Eigenschaft einer Bindung von Nukleotiden verfügen nämlich mindestens über drei Glycine ; der typische Lysinrest befindet sich immer stromab von der glycinreichen Schleife, entweder in einem Abstand von 11- 18 Aminosäuren im Fall der Proteinkinasen oder unmittelbar stromab des letzten Glycins im Fall anderer nukleotidbindender Proteine.

Die molekulare Basis der Bindung von Nukleotiden durch die großen Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten bleibt daher zunächst ungeklärt.

5.3.7. Nichttranslatierte Abschnitte der cDNA- Klone

Die nichttranslatierten 5'-terminalen Abschnitte von cDNA- Molekülen können einen Einfluß auf die Effizienz der Translation haben. Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA beeinflussen die Bindung an den 43S-Präinitiations-

komplex eukaryontischer Ribosomen, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Proteinbiosynthese darstellt (Review: Pelletier and Sonnenberg, 1987).

Bildung von zusätzlichen Sekundärstrukturen im 5'- nicht-kodierenden Abschnitt eukaryontischer mRNAs hemmt die Translation in vitro und in vivo (Pelletier and Sonnenberg, 1985).

Kozak (1986) berichtet über die Hemmung der in-vitro-Translation von Präproinsulin durch Einbau eines Segmentes in die 5'-nichttranslatierte Region der mRNA. Der eingebaute mRNA-Bereich ist G+C-reich und enthält eine inverse Sequenzwiederholung von 17 Nukleotiden. Er bildet eine Sekundärstruktur relativ großer Stabilität (Schmelztemperatur bei 0.9 M NaCl : 60°C).

In den cDNAs für die α - und β -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase können in den 5'-nichttranslatierten Abschnitten inverse Sequenzwiederholungen dieser Länge nicht gefunden werden. Jedoch findet sich in der α -cDNA eine inverse Sequenzwiederholung von 11 Nukleotiden (Beginn bei den Nukleotiden -187 und -130; theoretische Schmelztemperatur bei 0.9 M NaCl : 40°C).

Der 5'-nichttranslatierte Abschnitt der β -cDNA aus Muskel ist sehr G+C-reich.

Eine gemeinsame Regulation der Translation der Phosphorylase-Kinase-Untereinheiten ist sinnvoll, um die Synthese von sich entsprechenden Mengen der Polypeptide sicherzustellen. Eine ähnliche Sequenz der 5'-nichttranslatierten Abschnitte der cDNAs wäre ein Hinweis auf für beide

Untereinheiten gemeinsame Regulationsmechanismen auf Translationsebene. Die 5'-terminalen, untranslatierten Abschnitte der α - und β -cDNAs besitzen jedoch eine unterschiedliche Länge und sind sich in ihrer Sequenz nicht ähnlich.

Die 5'-terminalen Sequenzen der β -Klone aus Herz und Muskel unterscheiden sich in ihrer Sequenz, so daß die Existenz zweier verschiedener Transkriptionsstartstellen auf dem Strukturgen für die β -Untereinheit vermutet werden kann.-

Die Sequenzen in der Umgebung des Translationsbeginns zeigen bei allen Klonen eine nur mäßige Übereinstimmung mit der Konsensussequenz für den Translationsbeginn (Kozak, 1984).-

Am 3'-Ende besitzen die Klone für die α -Untereinheit nur zwei unvollständige Polyadenylierungssignale, die dem poly(A)-Schwanz vorausgehen. Die Klone für die β -Untereinheit aus Muskel und Herz unterscheiden sich in ihren 3'-terminalen Sequenzen (die Klone aus dem Herzen sind am 3'-Ende über 400 Nukleotide länger) und besitzen je ein vollständiges Polyadenylierungssignal kurz vor ihrem 3'-Ende. Ein poly(A)-Schwanz fehlt bei den Klonen der β -Untereinheit aus dem Skelettmuskel.-

Gemeinsame Signalsequenzen für eine koordinierte Regulation der Translation der α - und β -Untereinheiten konnten in den nichttranslatierten Abschnitten der cDNA-

Klone somit nicht gefunden werden. Möglicherweise erfolgt die Kontrolle der Proteinbiosynthese bei diesem Enzym hauptsächlich auf der Ebene der Transkription.

5.4. Zahl, Lokalisation und Organisation der Strukturgene der Untereinheiten von Phosphorylase-Kinase

Southern- Blot- Experimente belegen eine erhöhte Gendosierung für das Strukturgen der α - Untereinheit in einer Zelllinie mit 4 X-Chromosomen pro diploidem Genom (vgl. Abbildung 18).

Die Lokalisierung des α -Strukturgens auf dem X-Chromosom konnte mittels Hybridisierung der cDNA für die α - Untereinheit mit Chromosomen in situ und mit DNA aus interspezies-Hybridzelllinien in der Zwischenzeit im Labor von Uta Francke (Yale University) bestätigt werden; auch eine genauere Kartierung dieses Gens auf dem X-Chromosom ist gelungen (Manuskript in Vorbereitung). Auf gleiche Weise konnte das β - Strukturgen auf dem menschlichen Chromosom 16 lokalisiert werden.

In beiden Fällen gibt es keine Hinweise für ein zweites Strukturgen.

Die Isoformen der beiden großen Untereinheiten gehen somit auf ein unterschiedliches Spleißmuster von Primärtranskripten je eines Gens zurück.

Dies ist im Falle der β -Isoformen aus Muskel und Herz durch Isolierung entsprechender Klone im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt.

Alternatives Spleißen als Ursache für das Auftreten von Isoformen ist weitverbreitet. Von alternativem Spleißen spricht man, wenn eine Donor- Spleißstelle mit verschiedenen Akzeptor-Spleißstellen verbunden werden kann oder umgekehrt. Durch Transkription ausgehend von verschiedenen Promotoren und die Verwendung verschiedener Polyadenylierungssignale können außerdem verschiedene Primärtranskripte eines Gens synthetisiert werden (Review: Breitbart et al., 1987). Gerade für eine Reihe von muskelspezifischen Proteinen sind solche Prozesse beschrieben. So entstehen 64 verschiedene Isoformen des Troponins T der Ratte durch alternatives Spleißen einer prä-mRNA (Breitbart et al., 1985). Die sieben Isoformen des α -Tropomyosins der Ratte gehen auf die Verwendung zweier alternativer Polyadenylierungssignale und zusätzliches alternatives Spleißen der prä-mRNAs zurück (Breitbart et al., 1987). Im "Myosin Light Chain 1_f/3_f"- Gen führt die Transkription ausgehend von zwei Promotoren zu zwei verschiedenen prä-mRNAs, die zusätzlich unterschiedlich gespleißt werden (Strehler et al., 1985).

Im Falle des β - Strukturgens spricht die unterschiedliche 5'-terminale Sequenz der cDNAs p β Phk-D1N und 1 β HPhk1 für die Existenz von mehr als einem Promotor in diesem Gen. Außerdem macht die unterschiedliche Länge der 3'-nicht-

translatierten Abschnitte beider Klone und ihre unterschiedliche Sequenz die Verwendung zweier Polyadenylierungssignale durch die Isoformen der β -Untereinheit wahrscheinlich.

Im Sequenzbereich V besitzt jede der beiden klonierten Isoformen der β -Untereinheit ein oder mehrere spezifische Exons, die aus der prä-mRNA der je anderen Isoform herausgespleißt werden.-

Die Klonierung der Strukturgene der α - und β -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase ist nötig, um die Organisation dieser Gene im einzelnen aufzuklären.

cDNA-Fragmente der γ - Untereinheit von Phosphorylase-Kinase hybridisieren mit den menschlichen Chromosomen 7 und 11 (Chamberlain et al., 1987).

X-chromosomal vererbte Defizienzen von Phosphorylase-Kinase (vgl. Einleitung) beruhen somit mit großer Wahrscheinlichkeit auf einem Defekt im Strukturgen der α - Untereinheit, während autosomal vererbte Defekte in den Strukturgenen der β - und der γ - Untereinheit zu suchen sein dürften.

6. Zusammenfassung

cDNA- Klone voller Länge der α - und β -Untereinheit von Phosphorylase-Kinase aus weißem Kaninchenskelettmuskel wurden mit Hilfe von zur jeweiligen mRNA komplementären Oligonukleotidproben kloniert.

Aus der jeweiligen cDNA- Sequenz wurden die Primärstrukturen der beiden Untereinheiten abgeleitet. Die α - Untereinheit besteht aus 1237 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 138 422 Dalton, die β - Untereinheit besteht aus 1092 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 125 205 Dalton. Ungefähr die Hälfte beider Aminosäuresequenzen wurde durch Sequenzierung von Peptiden bestätigt.

Die Primärstruktur beider Untereinheiten ähnelt keiner anderen bekannten Proteinprimärstruktur. Hingegen sind die beiden Moleküle zueinander homolog und besitzen einen Aufbau aus einerseits zueinander homologen und andererseits für je eine Untereinheit spezifischen Domänen.

Alle sieben in der α -Untereinheit bisher lokalisierten Phosphoserine befinden sich in einer für die α -Untereinheit spezifischen Domäne in einem Bereich von insgesamt nur 60 Aminosäuren. Zwei der vier in der β - Untereinheit lokalisierten Phosphoserine befinden sich im spezifischen β - Aminoterminus.

Zwei mögliche Calmodulinbindungsstellen sind zwischen beiden Untereinheiten konserviert, die β -Untereinheit verfügt zusätzlich über eine für sie spezifische mögliche Calmodulinbindungsstelle in ihrem Aminoterminus. -

Es scheint somit, daß die beiden Untereinheiten sich im Laufe der Evolution aus ursprünglich einem Molekül entwickelt und dabei über einen strukturellen Umbau ("Exon Shuffling") einzelne, regulatorische und phosphorylierbare strukturelle Domänen hinzugewonnen haben.

cDNA- Klonen für die α - und β -Untereinheit wurden auch aus Herzmuskel kloniert und die Primärstrukturen der entsprechenden Polypeptide aus der cDNA-Sequenz abgeleitet. Die abgeleitete Primärstruktur der α -Untereinheit aus dem Herzen unterscheidet sich von der aus dem Muskel nicht. Hingegen zeigt die β -Untereinheit aus dem Herzen im Vergleich zum entsprechenden Polypeptid aus Muskel den Austausch zweier Sequenzbereiche und den Verlust eines dritten Bereichs. Von den Austauschen sind der Aminoterminus dieser Untereinheit und eine weitere mögliche Calmodulin-bindungsstelle betroffen. Der Verlust eines Teils der Sequenz in den Klonen der β -Untereinheit aus dem Herzen ist vermutlich artifiziell bedingt.

Das Prinzip des blockweisen Austausches von Primärstrukturbereichen mit funktioneller Relevanz ist somit auch auf der Ebene der Isoformen der β -Untereinheit - soweit bisher untersucht - durchgehalten.

Diese Isoformen entstehen bei beiden Untereinheiten durch alternatives Spleißen von Transkripten eines Gens.

Das β - Strukturgen verfügt vermutlich über mehr als einen Promotor und mehr als ein mögliches Polyadenylierungssignal. Das Strukturgen für die α -Untereinheit befindet sich auf dem X- Chromosom.

7. Literaturverzeichnis

- Amersham International (1986): cDNA cloning system - 4gt10, Amersham, UK.
- Angelos, K.L.; Ramachandran, C. and Walsh, D.A. (1986) : Subunit Phosphorylation and Activation of Phosphorylase Kinase in Perfused Rat Hearts. *J.Biol.Chem.* 262, 3219- 3226.
- Applied Biosystems (1984): Evaluation and Purification of Synthetic Oligonucleotides. Applied Biosystems User Bulletin, Issue No. 13.
- Auffray, C. and Rougeon, F. (1980) : Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur.J.Biochem.* 107, 303- 314.
- Bender, P.K. and Emerson, C.P. (1987) : Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase Catalytic Subunit mRNAs are Expressed in Heart Tissue, but not in Liver. *J.Biol.Chem.* 262, 8799-8805.
- Benedum, U.M.; Bäuerle, D.A.; Kovecki, D.S.; Frank, R.; Powell, J.; Mallet, J. and Huttner, W.B. (1986) : The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO J.* 7, 1495- 1502.
- Benovic, J.L.; Mayor, F., Jr.; Somers, R.L., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1986) : Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by β -adrenergic receptor kinase. *Nature* 321, 869- 872.
- Blumenthal, D.K.; Takio, K.; Edelmann, A.M.; Charbonneau, H.; Titani, K.; Walsh, K.A. and Krebs, E.G. (1985) : Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.US* 82, 3187- 3191.
- Breitbart, R.E.; Nguyen, H.T.; Medford, R.M.; Destree, A.T.; Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. (1985) : Intricate Combinatorial Patterns of Exon Splicing Generate Multiple Regulated Troponin T Isoforms from a Single Gene. *Cell* 41, 67-82.
- Breitbart, R.E.; Andreadis, A. and Nadal-Ginard, B. (1987) : Alternative Splicing: An Ubiquitous Mechanism for the Generation of Multiple Protein Isoforms from Single Genes. *Ann.Rev.Biochem.* 56, 467-495.
- Burchell, A.; Cohen, P.T.W. and Cohen, P. (1976) : Distribution of isoenzymes of the glycogenolytic cascade in different types of muscle. *FEBS Letters* 67, 17- 22.
- Buschmeier, B.; Meyer, H.E. and Mayr, G.W. (1987) : Characterization of the Calmodulin-binding Sites of Muscle Phosphofructokinase and Comparison with Known Calmodulin-binding Domains. *J.Biol.Chem.* 262, 9454 - 9462.

- Chamberlain, J.S., Van Tuinen, P., Reeves, A.A., Philip, B.A. and Caskey, C.T. (1987) : Isolation of cDNA clones for the catalytic subunit of mouse muscle phosphorylase kinase : Expression of mRNAs in normal and mutant Phk- mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.US* 84, 2886-2890.
- Chan, K.F.J. and Graves, D.J. (1982) : Isolation and Physico-Chemical Properties of Active Complexes of Rabbit Muscle Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 257, 5939- 5947.
- Cheng, A. Fitzgerald, T.J. and Carlson, G.M. (1985) : Adenosine 5'-Diphosphate as an Allosteric Effector of Phosphorylase Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J.Biol.Chem.* 260, 2535-2542.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978) : Empirical Predictions of Protein Conformation. *Annu.Rev.Biochem.* 47, 251-276.
- Chrisman, T.D., Jordan, J.E. and Exton, J.H. (1982) : Purification of Rat Liver Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 257, 10798-10804.
- Chrisman, T.D.; Sobo, G.E. and Exton, J.H. (1984) : The magnesium requirement of nonactivated and activated rat liver phosphorylase kinase. *FEBS Letters* 167, 295- 300.
- Cohen, P.(1973): The subunit structure of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase and the molecular basis of its activation reactions. *Eur.J.Biochem.* 34, 1- 14.
- Cohen, P.(1974) : The Role of Phosphorylase Kinase in the Nervous and Hormonal Control of Glykogenolysis in Muscle. *Biochem.Soc.Symp.* 39, 51.
- Cohen, P., Watson, D.C. and Dickson, G.H. (1975) : The hormonal control of activity of skeletal muscle phosphorylase kinase. *Eur.J.Biochem.* 51, 79-91.
- Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C. and Nairn, A.C. (1979): Identification of the calcium dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS Lett.* 92, 287- 293.
- Cohen, P.T.W.; Burchell, A. and Cohen, P. (1976) : The molecular basis of muscle phosphorylase kinase deficiency. *Eur.J.Biochem.* 60, 347- 356.
- Cooper, R.H., Sul, H.S., McCullough, T.E. and Walsh, D.A. (1980): Purification and Properties of the Cardiac Isozyme of Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 255, 11794-11801.
- Crabb, J.W. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1984) : HPLC Purification and Structure Characterization of the Subunits of Rabbit Muscle Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 259, 6346-6350.

- da Cruz e Silva, E.F. and Cohen, P.T.W. (1987) : Isolation and sequence analysis of a cDNA clone encoding the entire catalytic subunit of phosphorylase kinase. *FEBS Lett.* 220, 36-42.
- Daegelen-Proux, D.; Pierre, M.; Alexandre, Y. and Dreyfus, J.-C. (1976) : Molecular Heterogeneity of Rabbit Heart Phosphorylase Kinase. *Biochim.Biophys.Acta* 452, 398- 405.
- Daegelen-Proux, D., Alexandre, Y. and Dreyfus, J.-C (1978) : Phosphorylase kinase isoenzymes in deficient ICR/Ian mice. *Eur.J.Biochem.* 90, 369-375.
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. and Orcutt, B.C. (1978) : A Model of Evolutionary Changes in Proteins. in: *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Ed.: Dayhoff, M.O. . Natl.Biomed.Res.Found,Silver Spring, MD, USA Vol.5, Suppl.3, pp 345-352.
- Dickneite, G., Jennissen, H.P. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1978): Differentiation of two catalytic sites on phosphorylase kinase for phosphorylase b and troponin T phosphorylation. *FEBS Letters* 87, 297- 302.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) : A Technique for Radiolabelling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal. Biochem.*132, 6- 13.
- Fischer, E.G., Alaba, J.O., Brautigan, D.L., Kerrick, G.L., Malencik, D.A., Moeschler, H.J., Picton, C. and Pocinwong, S. (1978) : Evolutionary Aspects of the Structure and Regulation of Phosphorylase Kinase. in : *Versatility of Proteins*. Ed.: Li, C.H. Academic Press, New York, p.133
- Fry, D.C.; Kuby, S.A. and Mildvan, A.S. (1986) : ATP-binding site of adenylate kinase : Mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F₁-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci. US* 83, 907-911.
- Gahlmann, R.; Troutt, A.B.; Wade, R.P.; Gunning, P. and Kedes, L. (1987) : Alternative Splicing Generates Variants in Important Functional Domains of Human Slow Skeletal Troponin T. *J.Biol.Chem.* 262, 16122- 16126.
- Garton, A.J.; Campbell, D.G.; Cohen, P. and Yeaman, S.Y. (1988) : Primary structure of the site on bovine hormone-sensitive lipase phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS lett.* 229, 68- 72.
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M., and Mercier, R. (1981) : Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity, *Nuc.Ac.Res.* 29, 42-55
- Gross, S.R. and Bromwell, K. (1977) : Postnatal Development of Phosphorylase Kinase in Mouse Skeletal Muscle. *Arch.Biochem.Biophys.* 184, 1-11.

Gubler, U. and Hoffmann, B.J. (1983) : A Simple and Very Efficient Method for Generating cDNA Libraries. *Gene* 25, 263- 269.

Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) : The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. *Science* 241, 42-52.

Hayakawa, T., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1973): Studies on the Subunit Structure of Rabbit Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase. *Biochemistry* 12, 574 - 580.

Heilmeyer, L.M.G., Jr., Gröschel-Stewart, U., Jahnke, U., Kilimann, M.W., Kohse, K.P. and Varsanyi, M. (1980) : Novel Aspects of Skeletal Muscle Protein Kinase and Protein Phosphatase Regulation by Calcium. *Adv.Enzyme Regul.* 18, 121.

Hessova, Z., Varsanyi, M. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1985): Monoclonal Antibodies to Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 260, 10111- 10117.

Howell, R.R. and Williams, J.C. (1983) : The Glycogen Storage Diseases. in: *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. Eds.: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. Mc Graw-Hill, New York, 141- 166.

Hunter, T. (1987) : A Thousand and One Protein Kinases. *Cell* 50, 823- 829.

Jennissen, H.P. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1974) : Multiple forms of phosphorylase kinase in red and white skeletal muscle. *FEBS Lett.* 42, 77-80.

Kamps, M.P.; Taylor, S.S. and Sefton, B.M. (1984) : Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites. *Nature* 310, 589-592.

Kilimann, M.W. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1977) : The effect of magnesium ion on the calcium ion binding properties of non-activated phosphorylase kinase. *Eur.J.Biochem.* 73, 191- 197.

Kilimann, M.W. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1982a): Multiple Activities on Phosphorylase Kinase. 1.Characterization of Three Partial Activities by Their Response to Calcium Ion, Magnesium Ion, pH, and Ammonium Chloride and Effect of Activation by Phosphorylation and Proteolysis. *Biochemistry* 21, 1727-1734.

Kilimann, M.W. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1982b): Multiple Activities on Phosphorylase Kinase. 2.Different Specificities toward the Protein Substrates Phosphorylase b, Troponin and Phosphorylase Kinase. *Biochemistry* 21, 1735- 1739.

Kilimann, M.W., Zander, N.F., Kuhn, C.C., Crabb, J.W., Meyer, H.E. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. : The alpha and beta subunits of phosphorylase kinase are homologous: cDNA cloning and primary structure of the beta subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, in press.

King, M.M. and Carlson, G.M. (1981) : Interaction of Phosphorylase Kinase with 2',3'-dialdehyde Derivative of Adenosine Triphosphate. *Biochemistry* 20, 4382- 4393.

Kishimoto, A.; Nishiyama, K.; Nahanishi, H., Uratsuji, Y.; Nomura, H.; Takeyama, Y and Nishizuka, Y. (1985) : Studies on the Phosphorylation of Myelin Basic Protein by Protein Kinase C and Adenosine 3':5'-Monophosphate-dependent Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 260, 12492-12499.

Kohse, K.P. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1981) : The effect of magnesium on the calcium binding properties and calcium-induced tyrosine-fluorescence changes of calmodulin isolated from rabbit skeletal muscle. *Eur.J.Biochem.* 117, 507- 513.

Kozak, M. (1984) : Compilation and analysis of sequences upstream from the translation start site of eukaryotic mRNAs. *Nuc.Ac.Res.* 12, 857-872.

Kozak, M. (1986) : Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83, 2850- 2854.

Krebs, E.G. and Fisher, E.H. (1956) : The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim.Biophys.Acta* 20, 150- 157.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) : A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J.Mol.Biol.* 157, 105-132.

Laemmli, U.-K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.

Lambooy, P.K. and Steiner, R.F. (1982): The Crosslinking of Phosphorylase Kinase. *Arch.Biochem.Biophys.* 213, 551-556.

Lincoln, T.M. and Corbin, J.D. (1977) : Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and guanosin 3',5'-cyclic monophosphate dependent protein kinases:Possible homologous proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.US* 74, 3239- 3243.

Lyon, S.B. (1957) : Muscle and Liver Glycogen Levels in Lean and Obese Strains of Mice. *Am.J.Physiol.* 190, 434-438.

Lyon, S.B. (1970) : The X Chromosome and the Enzyme Control of Muscle Glycogen : Phosphorylase Kinase. *Biochem.Gen.* 4, 169-185.

Malthus, R., Clark, D.G., Watts, C. and Sneyd, J.G.T. (1980) : Glycogen-storage disease in rats: A genetically determined deficiency of liver phosphorylase kinase. *Biochem.J.* 188, 99-106.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) : Molecular Cloning- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Meyer, H.E., Hoffmann-Posorske, E., Kuhn, C.C. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1988) : Microcharacterization of Phosphoserine Containing Proteins. Localization of the Autophosphorylation Sites of Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase. in: Modern Methods in Protein Chemistry. Ed.: Tscheche, H. Walter de Gruyter & Co., Berlin. Vol.3, pp.185-212.

Meyer, H.E., Kuhn, C.C., Weber, C., Meyer, G.F., Dirks, H. and Heilmeyer, L.M.G., Jr. (1988) : Localization of Phosphoserine Residues in the Primary Structure of Phosphorylase Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. J.Biol.Chem., Manuskript eingereicht.

Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F. (1986) : Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosin triphosphate in place of dGTP. Nuc.Ac.Res.14, 1319-1324.

Nabeshima, Y.; Fujii-Kuriyama, Y.; Muramatsu, M. and Ogata, K. (1984) : Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene. Nature 308, 333-338.

Ohno, S. (1973) : Ancient linkage groups and frozen accidents. Nature 244, 259- 261.

Ohtsuka, E., Matsuki, S., Ikehara, M., Takahashi, Y. and Matsubara, K. (1985) : An Alternative Approach to Deoxyoligonucleotides as Hybridization Probes by Insertion of Deoxyinosine at Ambiguous Codon Positions. J.Biol.Chem. 260, 2605-2608.

Pearson, R.B.; Wettenhall, R.E.H.; Means, A.R.; Hartshorne, D.J. and Kemp, B.E. (1988) : Autoregulation of Enzymes by Pseudosubstrate Prototypes : Myosin Light Chain Kinase. Science 241, 970- 973.

Pelletier, J. and Sonnenberg, N. (1985) : Insertion Mutagenesis to Increase Secondary Structure within the 5' Noncoding Region of a Eukaryotic mRNA Reduces Translational Efficiency. Cell 40, 515-526.

Pelletier, J. and Sonnenberg, N. (1987) : The involvement of mRNA secondary structure in protein synthesis. Biochem.Cell Biol. 65, 576- 581.

Picket-Gies, C.A. and Walsh, D.A. (1986) : Phosphorylase Kinase. in: The Enzymes. Eds.: Boyer, P.D. and Krebs, E.G. Academic Press, Orlando, Florida, USA, Vol. XVII, 395-457.

Picton, C., Klee, C.B. and Cohen, P. (1980) : Phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle: Identification of the calmodulin binding subunits. *Eur.J.Biochem.* 111, 553- 561.

Picton, C.; Aitken, A. and Cohen, P. (1982) : Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. *Eur.J.Biochem.* 124, 37-45.

Reimann, E.M., Titani, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Fischer, E.H. and Walsh, K.A. (1984) : Homology of the gamma Subunit of Phosphorylase b Kinase with the cAMP Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* 23, 4185-4192.

Sakai, K.; Matsumura, S.; Okimura, Y.; Yamamura, H. and Nishizuka, Y. (1978) : Liver Glykogen Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 254, 6631- 6637.

Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) : DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.US* 74, 5463- 5467.

Schramm, H.J. and Jennissen, H.P. (1985) : Two-dimensional Electron Microscopic Analysis of the Chalice Form of Phosphorylase Kinase. *J.Mol.Biol.* 181, 503-516.

Singh, T.J. and Wang, J.H. (1977) : Effect of Magnesium Ion Concentration on the cAMP-dependent Protein Kinase-catalyzed Activation of Rabbit Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 252, 625- 632.

Skuster, J.R., Chan-Jesse, K.F. and Graves, D.J. (1980) : Isolation and properties of the Catalytically Active γ Subunit of Phosphorylase b Kinase. *J.Biol.Chem.* 255, 2203- 2210.

Strehler, E.E.; Perisamy, M., Stehler-Page, M.A. and Nadal-Ginard, B. (1985) : Myosin Light-Chain 1 and 3 Gene Has Two Structurally Distinct and Differentially Regulated Promoters Evolving at Different Rates. *Mol.Cell Biol.* 5, 3168- 3182.

Sul, H.S., Cooper, R.H., Whitehouse, S. and Walsh, D.A. (1981) : Cardiac Phosphorylase Kinase. *J.Biol.Chem.* 257, 3484- 3490.

Szostak, J.W., Styles, J.I., Tye, B.K. Chin, P., Sherman, F. and Wu, R. (1979) : Hybridisation with Synthetic Oligonucleotides. *Meth.i.Enzym.* 68, 419-428.

Thiel, G.; Czernik, A.J., Gorelick, F.; Nairn, A.C. and Greengard, P. (1988) : Calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II:Identification of thr-286 as the autophosphorylation site in the alpha subunit associated with the generation of calcium independent activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.US* 85, 6337- 6341.

Tuazon, P.T.; Bingham, E.W.; Traugh, J.A. (1979) : Cyclic nucleotide- independent protein kinases from rabbit reticulocytes. *Eur.J.Biochem.* 94, 497-504.

- Trempe, M.R., Carlson, G.M., Hainfeld, J.F., Furcinitti, P.S. and Wall, J.S. (1986) : Analyses of Phosphorylase Kinase by Transmission and Scanning Transmission Electron Microscopy. *J.Biol.Chem.* 261, 2882-2889.
- Vandenhede, J.R.; De Wulf, H. and Merlevede, W. (1979) : Liver phosphorylase b kinase. *Europ.J.Biochem.* 101, 51-58.
- van den Werve, G.; Hue, L. and Hers, H.-G. (1977) : Hormonal and ionic control of the glykogenolytic cascade in rat liver. *Biochem.J.* 162, 135-142.
- Walseth, T.F. and Johnson, R.A. (1979) : The Enzymatic Preparation of alpha-³²-P-Nucleoside Triphosphates, Cyclic ³²P-AMP and Cyclic ³²P-GMP. *Biochim.Biophys.Acta* 562, 11-31.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P., Broström, C.O., Ho, E.S. and Krebs, E.G. (1971) : Catalysis of the Phosphorylase Kinase Activation Reaction. *J.Biol.Chem.* 246, 1968-1976.
- Wood, W.I., Gitschier, J., Lasky, L.A. and Lawn, R.M. (1985) : Base composition- independent hybridisation in tetramethylammoniumchloride : A method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.US* 82, 1585-1588.
- Yeaman, S.Y. and Cohen, P. (1975) : The hormonal control of activity of skeletal muscle phosphorylase kinase. *Eur.J.Biochem.* 51, 93-104.
- Yeaman, S.J., Cohen, P., Watson, D.C. and Dixon, G.H. (1977) : The substrate specificity of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase of rabbit skeletal muscle. *Biochem.J.* 162, 411-421.
- Young, B.D. and Anderson, M.L.M. (1985) : Quantitative Analysis of Solution Hybridisation. in: *Nucleic Acids Hybridisation*. Eds.: Hames, B.D. and Higgins, S.J. .IRL Press, Oxford. pp 47-72.
- Zaman, N.; Varsanyi, M.; Heilmeyer, L.M.G., Jr.; Sotiroidis, T.G., Johnson, C.M. and Crabb, J.W. : Reaction of fluorescein isothiocyanate with an ATP binding site on the phosphorylase kinase alpha subunit. *Eur.J.Biochem.*, im Druck.
- Zander, N.F., Meyer, H.E., Hoffmann-Posorske, E., Crabb, J.W., Heilmeyer, L.M.G., Jr. and Kilimann, M.W. (1988) : cDNA cloning and complete primary structure of skeletal muscle phosphorylase kinase (alpha subunit). *Proc.Natl.Acad.Sci.US* 85, 2929-2933.

Dank

Herrn Prof. Dr. Ludwig M.G. Heilmeyer, Jr., danke ich für die Aufnahme ins Institut für Physiologische Chemie und die Annahme als Doktorand.

Für die Betreuung meines Promotionsvorhabens, viele Anregungen und für mich bereichernde Gespräche möchte ich mich bei Herrn Dr.Dr. Manfred W. Kilimann bedanken.

Frau Angela Sauerwald, Frau Beate Harmann , Frau Beate Lichte und Frau Martina Preiß danke ich für die gute Zusammenarbeit und manche Hilfe im Laboralltag.

Ohne die Unterstützung im Rahmen des Graduiertenförderungsprogrammes der Bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk hätte ich dieses Promotionsvorhaben nicht verwirklichen können; auch hierfür möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Lebenslauf Norbert Zander

- 26.4.1960 geboren als Sohn des Ingenieurs Friedrich Zander und der Industriekauffrau Irene Zander, geb. Kaluzny, in Mülheim a.d. Ruhr.
- 1966-1970 Grundschule in Mülheim.
- 1970-1979 Otto- Pankok- Schule in Mülheim.
- Mai 1979 Abitur.
- 1979/1980 Zivildienst.
- Okt. 1980 Aufnahme des Studiums der Biologie an der Ruhr- Universität Bochum.
- Feb. 1986 Abschluß des Studiums mit dem Diplom.
Diplomarbeit über " Temperatursprungrelaxationsmessungen an saurem Methämoglobin "
(Institut für Biophysik).
- 1986-1989 Promotionsstudium am Institut für Physiologische Chemie - Abteilung für Biochemie Supramolekularer Systeme der Ruhr-Universität Bochum.
- 1986-1989 Mitglied in der Graduiertenförderung der Bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk.

